

Année scolaire 1962-1963

Série U - N° 379

THÈSE

présentée à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

par

Fred GLAUDON

Pharmacien

Diplômé de Sérologie, Parasitologie

Né le 3 Mars 1937, à Fort-de-France (Martinique)

Soutenue le 14 juin 1963, devant la commission d'examen

Contribution à la mise en évidence d'une activité amœbicide «in vitro» et «in vivo»

JURY

MM. R. CAVIER, Président
A. GERMAN, Professeur
J. SAVEL, Maître de Conférences

I M P R I M E R I E

R. FOULON & C^{ie}

29, RUE DEPARCIEUX, 29

PARIS — 1963

Année scolaire 1962-1963

Série U - N° 379

THÈSE

présentée à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

par

Fred GLAUDON

Pharmacien

Diplômé de Sérologie, Parasitologie

Né le 3 Mars 1937, à Fort-de-France (Martinique)

Soutenue le 14 juin 1963, devant la commission d'examen

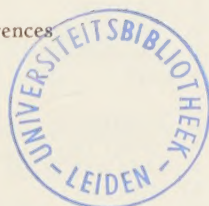
Contribution à la mise en évidence d'une activité amœbicide «in vitro» et «in vivo»

JURY

MM. R. CAVIER, Président

A. GERMAN, Professeur

J. SAVEL, Maître de Conférences



I M P R I M E R I E

R. FOULON & C^{ie}

29, RUE DEPARCIEUX, 29

PARIS — 1963

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. G. VALETTE	<i>Doyen</i>
M. JANOT	<i>Assesseur</i>
P. MALANGEAU	<i>Assesseur</i>
L. RODINEAU	<i>Secrétaire Général</i>
L. JEANDEL	<i>Secrétaire Général Adjoint</i>
Mme S. CERTAIN	<i>Secrétaire</i>
M.L. ESPINASSE	<i>Secrétaire</i>
G. FROISSART	<i>Secrétaire</i>

DOYEN HONORAIRE

M. R. FABRE	Président de l'Académie de Médecine, Membre de l'Institut
-------------------	--

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. M. DELEPINE	Membre de l'Institut
L. LAUNOY	
P. FLEURY	
M. MASCRE	
M. PICON	
C. BEDEL	
R. FABRE	Président de l'Académie de Médecine Membre de l'Institut

PROFESSEURS

MM. M.M. JANOT	Pharmacie Galénique (T.)
G. VALETTE	Pharmacodynamie (T.)
R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments sim- ples d'origine végétale (T.)
M. GUILLOT	Physique (T.)
J. GAUTIER	Chimie organique (T.)
Mlle S. LAMBIN	Microbiologie (T.)
MM. Y. RAOUL	Physiologie (T.)
J. COURTOIS	Chimie biologique (T.)
L. DOMANGE	Chimie minérale (T.)
P. CRETE	Botanique (T.)
R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T.)
A. MORETTE	Hydrologie (T.)
MM. R. CAVIER	Parasitologie (T.)
A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire (T.)
R. MOREAU	Pharmacie chimique (T.)
J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
A. GERMAN	Virologie et Sérologie (T.P.)
M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
P. MALANGEAU	Chimie analytique (T.)
M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T.)
G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.)
J. FLAHAUT	Minéralogie (T.P.)
G. DEYSSON	Cytologie végétale (T.P.)
A. LE HIR	Pharmacie Galénique
J. RENAULT	Chimie organique

MM. C. BOUDENE	Toxicologie et Hygiène industrielle
P. LARUELLE	Physique
P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
A. MANGEOT	Pharmacie Galénique industrielle
P. DELAVEAU	Matière médicale

MAITRES DE CONFERENCES

MM. Y. COHEN	Sciences naturelles
G. LE MOAN	Toxicologie
H. RENAULT	Pharmacie chimique
C. PAOLETTI	Sciences appliquées
P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
J. POISSON	Sciences naturelles
A. DESVIGNES	Microbiologie
F. PERCHERON	Biochimie
J. SAVEL	Sciences naturelles
J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. P. BINET	Parasitologie
A. CAVE (FF)	Pharmacotechnie chimique et galénique
P. CORRIEZ	Physique
C. DREUX	Electrochimie appliquée à l'analyse
P. GESTEAU	Physique biologique
J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section biologie).
H. GUERIN	Micrographie (3 ^e année), Biologie végétale
J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
J. HENRY	Chimie (4 ^e année)
Mme J. HUBERT	Microbiologie
MM. R. LELUC	Microbiologie
M. LEMONNIER	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e année)
Mme S. LEMONTEY	Chimie (4 ^e année)
Mlle S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
H. MORIN	Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
MM. F. PELLERIN	Chimie analytique
R. PERLES	Chimie biologique
J. PESTIS (FF)	Biologie animale
R. POULAIN	Hématologie
Mme M. ROBERT	Sérologie
Mlle A. ROLLEN	Biologie végétale
L. SEGUIN (FF)	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section physico-chimie)
Mme L. SEILLER (FF)	Pharmacie galénique industrielle
M. J. YONGER (FF)	Chimie analytique (1 ^{re} année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. J. MANDEREAU	Chef de travaux pratiques de pharmacotechnie galénique
-----------------------	--

BIBLIOTHEQUE

Mlle Y. RUYSSSEN	Conservateur chargé de la Direction
S. LAVAUD	Conservateur
Mme G. KREHMER	Conservateur
A. DESGRIPPES	Bibliothécaire



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MA MÈRE

A MON PÈRE

Leur vie constitue pour moi le plus précieux des exemples.

A MES SŒURS

A MES FRÈRES

A MA FAMILLE

A CEUX QUI ME SONT CHERS

Témoignage d'affection.

A TOUS CEUX QUE J'ESTIME

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR RAYMOND CAVIER

Professeur de Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien en Chef du Groupe Hospitalier Paul-Brousse

*A qui nous devons le sujet de cette thèse.
Modeste témoignage de respectueuse gra-
titude et d'admiration.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ALBERT GERMAN

Professeur de Virologie et de Sérologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

*Nous le remercions de l'honneur qu'il
nous fait en jugeant ce travail.*

A MONSIEUR JEAN SAVEL

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

*Dont l'activité scientifique anime le labo-
ratoire dans lequel nous avons travaillé.
Sa présence dans notre Jury nous honore.*

INTRODUCTION

Les premiers contacts bibliographiques avec l'amibiase nous révélèrent rapidement l'envergure du sujet et ceci en même temps qu'ils nous firent connaître les nombreux travaux déjà réalisés dans ce domaine.

Cependant, en dépit de tant de recherches, bien des questions n'ont pas encore reçu de réponses pleinement satisfaisantes ; la symptomatologie et l'épidémiologie de cette maladie, par exemple, ou l'étude expérimentale du pouvoir pathogène de l'amibe elle-même comportent des points mal définis.

Par ailleurs, si, sur un plan pharmacologique, nous considérons plus particulièrement les techniques classiques d'essai des antiambiens, nous constatons que certaines difficultés et imprécisions justifient pleinement de nouvelles recherches. C'est dans cette voie que, sur les conseils de notre Maître, le Professeur CAVIER, nous avons entrepris ce travail.

Dans cette introduction, nous n'insisterons pas sur la physiopathologie ou l'importance étiologique de l'amibiase, là n'est ni notre sujet, ni notre compétence. Un bref rappel de la pathogénie et de la thérapeutique de cette affection nous permettra simplement de définir notre but et de préciser les moyens à mettre en œuvre pour tenter d'y parvenir.

En effet, si, d'une manière générale, le diagnostic de l'amibiase n'oppose pas de difficultés particulières, en revanche, l'étude de sa pathogénie, et, par conséquent, celle de la virulence de son agent causal *Entamoeba dysenteriae*, qu'elle soit observée cliniquement chez le malade ou étudiée expérimentalement sur l'animal, réservent des surprises et des incertitudes.

Il en est de même pour sa thérapeutique ; car, si celle-ci a fait d'immenses progrès, surtout à partir de la découverte de l'émétine, puis, plus tard, grâce à la mise au point de nombreux médicaments de synthèse, il est indéniable que l'on se trouve encore souvent, à l'heure actuelle, en présence d'échecs trop nombreux.

Ainsi, la thérapeutique de l'amibiase, de même que l'étude de la virulence des différentes souches d'amibes, nécessitent de nouveaux travaux. Pour n'insister, ici, que sur l'aspect pharmacologique, et, en dépit des nombreuses substances déjà présentées par le traitement de cette maladie, il reste donc souhaitable que le chimiste en propose sans cesse de nouvelles et que le chercheur de laboratoire améliore et perfectionne au maximum les techniques d'épreuve qui lui permettent de choisir parmi toutes les substances proposées, les plus actives, les plus efficaces et les mieux tolérées.

Au laboratoire, l'essai pharmacologique d'un antiamibien comporte habituellement deux séries d'épreuves :

1) la confrontation *in vitro* avec des amibes entretenues en cultures ;

2) un test d'activité chez un animal naturellement ou mieux expérimentalement infesté.

Une étude détaillée des techniques d'essai généralement mises en œuvre pour réaliser l'ensemble de cette épreuve pharmacologique, nous les a révélées nombreuses et nous a montré combien leurs modalités d'application étaient variées et comportaient de difficultés et d'imperfections auxquelles il importait de remédier.

Un effort vers une standardisation des techniques d'essai était nécessaire, et Monsieur le Professeur CAVIER, nous le faisant remarquer, nous proposa d'aborder ce problème.

Nous avons alors orienté nos recherches vers la mise au point d'une épreuve simple, fidèle et pratique pour l'étude des produits amœbicides.

Dès le départ, deux nécessités se sont imposées comme conditions d'une telle étude :

1° La possibilité de disposer de méthodes de cultures faciles et commodes d'*Entamoeba dysenteriae* qui permettraient l'expérimentation *in vitro*.

2° La possibilité d'utiliser pour l'épreuve *in vivo* l'infestation spontanée ou expérimentale d'un animal de laboratoire.

En raison de ces impératifs, nous avons distingué trois étapes dans notre travail.

Tout d'abord, nous avons voulu nous familiariser avec les diverses manières de cultiver l'amibe dysentérique, tout en cherchant à déterminer parmi celles-ci les plus convenables à l'entretien des souches au laboratoire, et les plus sûres pour les essais *in vitro* qui devaient suivre.

La deuxième étape, bénéficiant des mises en garde et expériences de la précédente, fut celle de nos essais *in vitro* après que nous eûmes adopté et mis au point une technique d'essai.

Enfin, dans une dernière partie, que nous avons réservée à l'expérimentation *in vivo*, nous avons abordé la question de l'infestation expérimentale de l'animal, et elle nous conduisit à une étude de la virulence de l'amibe dysentérique de culture.

Pour notre expérimentation sur l'animal, des raisons d'ordre pratique nous firent choisir l'utilisation du Rat, puis du Hamster doré. Chez le premier animal, nous nous sommes efforcés, par divers procédés, de réaliser l'infestation expérimentale à partir de souches d'amibes (*Entamœba dysenteriae*) que nous entretenions au laboratoire et qui, primitivement, s'étaient révélées avirulentes pour ce même animal.

Chez le second, utilisant une infestation spontanée par *Entamœba criceti*, nos expériences ont cherché à mettre en évidence la sensibilité de cette amibe vis-à-vis des principaux amœbicides connus. Cette sensibilité s'est avérée comparable à celle d'*Entamœba dysenteriae* ; nous avons alors conclu à la possibilité d'adopter une telle infestation comme base d'une nouvelle technique d'essai, complémentaire de l'expérimentation *in vitro*.

Nos recherches ont été effectuées selon le programme que nous venons de tracer et nous les exposerons ici en quatre chapitres successifs.

1) La culture d'*Entamœba dysenteriae* fera l'objet du premier chapitre ; nous y présenterons, après un rapide aperçu historique, les principales techniques permettant la culture de l'amibe ; nous insisterons plus particulièrement sur trois techniques de culture que nous avons éprouvées et préférées à toutes les autres, ceci pour des raisons que nous dirons.

2) Dans le chapitre suivant, nous proposerons en détail les deux techniques d'essai *in vitro* que nous avons adoptées ; nous les illustrons des résultats obtenus avec diverses substances amœbicides.

3) Le troisième chapitre, celui où notre modeste travail a connu le plus de fluctuations, du fait de plusieurs tentatives non toujours couronnées de succès, nous permettra de présenter successivement : une étude de l'infestation expérimentale du Rat de laboratoire ; le problème d'*Entamœba muris* ; une nouvelle technique d'essai ; nos expériences sur la virulence d'*Entamœba dysenteriae*.

4) Puis, dans un quatrième chapitre, nous exposerons quelques essais chimiothérapiques effectués en utilisant l'amibiase spontanée du Hamster doré.

Pour la commodité de la présentation, nous avons généralement réservé, dans nos exposés, une première partie pour les travaux antérieurs et une deuxième pour nos travaux personnels.

Nous ne saurions, cependant, commencer cet exposé sans exprimer nos très vifs remerciements à notre Maître, Monsieur le Professeur CAVIER, Professeur de Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Un tel travail, pendant le cours duquel il a fallu recourir à une haute compétence et à de nombreux conseils éclairés, n'eût pas été possible sans son aide et sans la confiance qu'il nous a toujours accordée. L'enthousiasme, sans cesse éprouvé, à effectuer nos recherches dans son laboratoire, était déjà une manière tacite de lui manifester toute notre gratitude ; mais néanmoins, aujourd'hui à l'aboutissement de cette thèse, nous sommes très heureux de la lui offrir en hommage et de lui dire combien nous lui sommes reconnaissant, pour l'amabilité sans réserve et la très appréciable bienveillance dont, constamment, il nous a entouré.

Nos remerciements vont également à Monsieur SVEL, Maître de Conférences, et à Monsieur GEORGES, Assistant, pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportée à l'exécution de ce travail.

A tous nos Amis du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, et en particulier à Mesdemoiselles CHABROL et VILOT, dont l'aide nous a été précieuse, nous adressons l'expression de notre reconnaissance et de notre vive sympathie.

LA CULTURE DE L'AMIBE DYSENTERIQUE

PLAN DU CHAPITRE

- I — APERÇU HISTORIQUE
 - II — PRINCIPALES TECHNIQUES DE CULTURE
 - III — ETUDE PARTICULIERE DE TROIS MILIEUX DE CULTURE
 - IV — CONDUITE DE LA CULTURE ET FACTEURS INFLUENÇANTS
 - *Conduite des cultures*
 - *Action de la température*
 - *pH des cultures*
 - *La flore associée*
 - *Les aliments figurés et éléments divers*
 - V — MORPHOLOGIE ET CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE L'AMIBE DYSENTERIQUE
 - VI — CONCLUSIONS
-

I. APERÇU HISTORIQUE

AVANT-PROPOS

L'histoire de la culture d'*Entamœba dysenteriae* ne commence véritablement qu'en 1924, à la suite du XX^e Congrès de la Société Américaine de Médecine Tropicale. Deux auteurs, en effet, BOECK et DRBOHLAV, dans une note intitulée « La culture d'une amibe pathogène, *Entamœba histolytica*, à partir d'un cas de dysenterie amibienne », y présentaient, pour la première fois, la solution décisive au problème de la culture de l'amibe dysentérique.

Avant cette date, cependant, de nombreuses tentatives avaient été faites pour cultiver soit des amibes libres, soit *Entamœba dysenteriae*. Il nous semble intéressant, ici, d'en rappeler brièvement la chronologie et les divers procédés de culture utilisés par les auteurs : ceux-ci ayant eu à résoudre, dès leurs premières recherches, les mêmes difficultés que celles que nous éprouvons actuellement. De plus, cet exposé historique, dont l'essentiel se trouve dans les travaux de LANGERON [56], COURDURIER [21], LAMY [53], SAUTET [76], DOBELL [32], offrira l'avantage de permettre de suivre l'évolution des connaissances sur l'amibe dysentérique, sa morphologie, son diagnostic, sa pathogénie.

HISTORIQUE

Si l'on excepte les essais de culture de AUERBACK, en 1856, et quinze ans plus tard, ceux de CUNNINGHAM et LEWIS, à la suite de leur découverte des amibes intestinales de l'Homme, il faut attendre les travaux de KARTULIS, en 1891, pour obtenir les premiers renseignements sur cette question. Quelques temps après sa découverte des abcès du foie dû aux amibes, KARTULIS annonçait, en effet, qu'il avait réussi à cultiver l'amibe dysentérique, en utilisant comme milieu des infusions de paille stérilisées et exposées à l'air. Ayant constaté que

ces amibes déterminaient chez le chat une dysenterie typique, il pensa qu'elles conservaient leur pouvoir pathogène en culture.

Mais ces assertions furent réfutées, en 1894, par CASAGRANDE et BARBAGALLO, CELLI et FIOCCA qui prétendirent que les amibes cultivées par KARTULIS n'étaient que des amibes libres et la « dysenterie » causée au Chat une simple diarrhée banale.

CELLI et FIOCCA essayèrent à leur tour de cultiver l'amibe pathogène, mais sans résultat ; ils ne parvinrent pas non plus à séparer, dans des cultures d'espèces différentes, les protozoaires des microbes qui les accompagnent.

A la suite des échecs enregistrés avec l'amibe dysentérique, les auteurs expérimentent avec des amibes libres.

Ainsi travaillent BEYERINCK, puis FROSCH, en 1897 ; ils font également des essais de culture pure et mixte et de développement de kystes ; mais leurs résultats sont peu concluants.

En 1898, ZAUBITER reprend les travaux de FROSCH ; il conclut alors à la nécessité de la présence des microbes vivants dans les cultures d'amibes.

MOUTON, en 1902, avec une amibe de la terre, réussit une culture sur gélose.

Ce sont MUSGRAVE et CEGG qui font connaître les premières tentatives de culture d'amibes, à partir de selles dysentériques. Les auteurs obtiennent alors des cultures d'amibes qui sont pathogènes pour le Singe, mais non pour le Chat. Cependant la description de ces amibes aurait déjà suffi à les distinguer d'*Entamœba dysenteriae* si les travaux ultérieurs de WALKER n'étaient venus confirmer qu'il ne s'agissait que d'amibes libres.

Vers cette même époque, SCHAUDINN affirme qu'il convient de distinguer au point de vue morphologique, *Entamœba coli* et l'agent causal de la dysenterie amibienne. Il fait de ce dernier une espèce distincte qu'il nomme *Entamœba histolytica* et qui possède seule le pouvoir pathogène.

LESAGE tente alors de vérifier les assertions de SCHAUDINN en cultivant des amibes, à partir de fèces de malades atteints de dysenterie. Sur un milieu gélosé et aux températures de 18°C et 25°C, il obtient des cultures qui, dit-il, se sont conservées plusieurs mois. Mais, les amibes poussent au milieu d'une flore microbienne abondante ; aussi l'auteur tente-t-il, mais vainement, de réaliser la culture pure mixte ; il essaie aussi de faire enkyster les amibes pour pratiquer une culture de kystes, mais là encore sans succès.

Au point de vue expérimental, l'auteur prétend aussi avoir réalisé la maladie chez le Chat.

Les caractères morphologiques des amibes, décrites par LESAGE, les différenciaient déjà d'avec *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN ; de plus, DOBELL, en 1919, dans son livre « The amoebæ living in man », viendra réfuter l'authenticité des expériences de LESAGE, ne voyant dans les amibes cultivées par celui-ci que des amibes libres.

En 1909, WALKER travaille sur des amibes de l'Homme et des animaux. Toujours dans des milieux à base de gélose, il étudie l'influence de l'acidité sur les cultures ; il obtient des cultures pures mixtes, mais échoue dans ses essais de cultures pures.

WERNER, aussi, cultive facilement une amibe libre (*A. limax*), mais il ne peut cultiver l'amibe pathogène.

À la même époque, en Cochinchine, NOC réalise à son tour des cultures d'amibes à partir de selles dysentériques, d'abcès de foie et à partir des eaux de la ville de Saïgon. Des selles de dysentériques notamment, il isole des amibes de 30 à 60 μ de dimension, dont certaines présentent, dans leur cytoplasme, de nombreux globules rouges. De même, à partir des lésions d'un abcès du foie, il cultive des amibes qui présentent un endoplasme brillant, un ectoplasme vacuolaire, et dont le noyau, excentrique, n'est pas très visible ; ces amibes donneraient des kystes après trente-six heures de culture.

NOC pense avoir cultivé l'amibe pathogène ; mais DOBELL, plus tard, jugeant les travaux de NOC, dira que

« ces amibes se rapprochaient d'*Entamoeba histolytica*, surtout celles isolées à partir de fèces, mais que les amibes cultivées étaient certainement des amibes libres et non *E. histolytica* étant donné le résultat sûrement négatif des inoculations au chat ».

En 1909 aussi, Von WASILIENSKY et HIRSCHFELD cultivent facilement des amibes libres à 22°-24°C, et WELLS, un peu plus tard, réalise une expérience qui fournit la preuve de bien des erreurs antérieures.

WELLS obtient en effet des cultures d'amibes du genre *Limax* simplement en exposant à l'air des boîtes de Pétri, contenant les principaux milieux utilisés à cette époque ; de même, il réussit, sans difficulté, des cultures d'amibes non dysentériques, à partir de selles dysentériques ou d'abcès de foie, grâce à la méthode de MUSGRAVE et CLEGG.

WELLS démontre ainsi que les techniques employées sont mauvaises et les contaminations trop faciles, pour que l'on puisse se permettre d'affirmer la réussite d'une culture d'*Entamoeba dysenteriae*.

Vers la même époque, en 1911, WALKER qui reprit ses travaux antérieurs, arrive à la conclusion qu'il n'avait pas cultivé l'amibe

pathogène, pas plus d'ailleurs que ses prédécesseurs, MUSGRAVE, CLEGG, NOC, GAUDUCHEAU, etc., mais des amibes commensales.

CHATTON et LELUNG-BONNAIRE critiquent toutes les expériences antérieures dans lesquelles les auteurs n'avaient pas pensé à la possibilité d'une contamination, expriment le même point de vue que WALKER et, en guise d'explication, reprennent l'hypothèse de VAGLER.

En 1909, en effet, VAGLER avait émis l'hypothèse que les cultures d'amibes généralement obtenues, provenaient de kystes ingérés par l'homme avec ses aliments et qui, présents dans les selles, se mettaient à pousser sur les milieux de culture, alors que l'amibe dysentérique était détruite.

Ainsi, jusqu'à ce moment, le problème de la culture de l'amibe dysentérique demeurait entier ; et si sa connaissance morphologique avait gagné quelques précisions, à la suite des travaux de SCHAUDINN et WALKER notamment, la question de son pouvoir pathogène, par contre, était loin d'être résolue ; jusqu'alors, en effet, les observations contradictoires faites à propos des cultures et des inoculations de l'animal n'avaient pas permis de reconnaître un pouvoir pathogène certain à une amibe qui fût sûrement *Entamœba dysenteriae*.

Les expériences décisives de WALKER et SELLARDS permirent de trancher la question. Après avoir fait ingérer à des sujets des kystes d'*Entamœba dysenteriae*, les auteurs obtiennent 4 cas de dysenterie aiguë et 14 cas d'élimination asymptomatique de kystes. Ils retrouvent facilement *Entamœba dysenteriae* dans les selles des malades, mais pas une seule fois ils ne peuvent obtenir une culture d'amibes.

WALKER et SELLARDS donnaient ainsi la preuve de la faillite de toutes les premières tentatives faites jusqu'alors pour cultiver *Entamœba dysenteriae*.

Cependant les recherches recommencent aussitôt, et la même année, COURET et WALKER tentent des essais de culture pure sur des autolysats de tissus. Dans des milieux constitués de gélose inclinée et additionnée des extraits d'autolysats, les auteurs cultivent plusieurs amibes à partir d'un abcès de foie et du contenu intestinal dans un cas de dysenterie très nette.

Mais ces auteurs ne donnent pas de description des amibes qu'ils ont cultivées, ni d'indications sur leur pouvoir pathogène ; en conséquence, et compte tenu de ce qui a été dit précédemment, on doit considérer avec scepticisme les conclusions de COURET et WALKER.

En 1916, WOODCOCK et DREW tentent l'obtention de cultures virulentes à partir de kystes d'*Entamœba dysenteriae*. Ils utilisent pour la première fois une technique d'enrichissement des selles, fondée sur la centrifugation, et, pour favoriser le dékystement, ils ajoutent

à leur milieu de la pepsine en milieu acide et des extraits pancréatiques ; le milieu comprend en outre un liquide albumineux et de la gélose au sang ; la température adoptée, fait nouveau, est 37°C.

Les auteurs semblent avoir obtenu des résultats positifs, mais DOBELL, un peu plus tard, reprenant ces mêmes expériences avec STEVENSON, ne peut obtenir aucun développement de kystes.

En 1918, CUTLER fait paraître un intéressant travail, où il annonce avoir réalisé la culture d'*E. dysenteriae*. A partir de 45 échantillons de fèces dysentériques, l'auteur réussit 6 cultures en utilisant des milieux très variés : le milieu de MUSGRAVE et CLEGG, la gélose ordinaire ou les milieux courants en bactériologie (milieu de l'œuf de DEAN et MONAT, additionné de sang, et milieux au sang coagulé). CUTLER obtient ainsi des cultures d'amibes à la température de 37°C et tout aussi bien à 27°-28°C : la rapide pollution de ses milieux et les variations très gênantes du pH l'obligent à effectuer des repiquages quotidiens.

CUTLER décrit des amibes de 15 à 18 μ très mobiles et renfermant des hématies. Il observe également des enkystements d'apparition spontanée ou qu'il provoque lui-même par arrêt momentané des repiquages et mise en glacière du matériel ; les kystes inoculés à des chats, leur infligent une sévère dysenterie mortelle avec présence d'amibes végétatives dans les selles.

Plus tard, DOBELL et DOUGLAS reprenant point par point les techniques de CUTLER, ne parviennent pas à entretenir des cultures d'*Entamoeba dysenteriae* et concluent que les milieux utilisés par cet auteur peuvent à la rigueur servir de milieux de conservation, pendant un temps assez court, mais qu'ils paraissent impropres à l'entretien prolongé des souches.

Ainsi, jusqu'à ce moment, malgré une nouvelle tentative de YOSHIDA qui utilise des milieux à base de liquide de Ringer et de sérum de cheval, puis de gélose et de sang de cheval, le problème de la culture de l'amibe dysentérique n'est pas résolu ; et en 1919, DOBELL pouvait dire fort justement dans son livre précédemment cité :

« ... Il y a peu de chercheurs qui croient actuellement que *Entamoeba histolytica* soit cultivable par les méthodes connues... »

Pourtant, quelques années plus tard, BARRET et SMITH devaient cultiver une amibe pathogène de la Tortue, en se servant d'un milieu à base de sérum humain et d'eau salée et, des mois après, BOECK et DRBOHLAV faisaient connaître qu'ils avaient obtenu la culture effective d'*Entamoeba dysenteriae*.

En 1924, en effet, au cours de leurs essais de culture des flagellés intestinaux sur un milieu de BOECK et DRBOHLAV, ils voient pousser des amibes au fond de leurs tubes. La culture se confirme ; les auteurs effectuent alors rapidement la mise au point d'une technique et ils parviennent ainsi à isoler et cultiver plusieurs souches d'amibes dysentériques qui se révèlent pathogènes pour le Chat.

Certains de leur réussite, BOECK et DRBOHLAV donnent aussitôt à Londres, puis à Paris, des démonstrations et confirmations du succès de leur technique. Ils en expriment ainsi les principes généraux :

1° Emploi d'un milieu diphasique, solide et liquide, stérilisé et dont le pH de départ est compris entre 7,2 et 7,8.

2° Chauffage du tube de culture à 37°C avant l'ensemencement.

3° Ensemencement des formes actives d'*Entamœba dysenteriae* dans le fond du tube, à la limite de séparation des deux phases.

4° Repiquages tous les trois à quatre jours.

A partir de ce moment, bien des publications viennent confirmer le succès de la technique (DOBELL, LAIDLAW, GUERIN, CUPTA, THOMPSON et ROBERTSON) et l'intérêt de la découverte inspire de nombreux protozoologistes. On les voit, dès lors, s'appliquer à améliorer la technique de BOECK et DRBOHLAV, lui apportant modifications et perfectionnements de toutes sortes, et aussi proposer de nouveaux milieux et d'autres techniques.

BRUMPT, en même temps que DOBELL et LAIDLAW, semble-t-il, préconise une importante modification ; elle consiste en l'addition d'amidon de riz retenu comme facteur favorisant la croissance des amibes.

JOHN, YORKE et ADAMS parviennent à cultiver *Entamœba dysenteriae* à partir de kystes à quatre noyaux, en les ensemençant sur liquide de Locke, additionné de sérum de cheval.

La même année, paraît un travail de DOBELL et LAIDLAW, qui est en quelque sorte une mise au point de tous les travaux faits jusqu'alors. Les auteurs y donnent une explication détaillée du rôle de l'amidon de riz dans les cultures, ainsi qu'un exposé de leur technique de culture des kystes ; ils présentent aussi la formule d'un nouveau milieu se composant de sérum de cheval coagulé, de liquide de Ringer albuminé et d'amidon de riz.

DESCHIENS apporte une nouvelle modification au milieu classique proposant l'eau salée albuminée comme partie liquide, et il souligne l'importance du pH des cultures. Son milieu se rapproche de celui de CRAIG.

En 1928, à la suite de leurs expériences sur l'action de l'émétine *in vitro*, LAIDLAW, DOBELL et BISCHOP proposent un milieu entièrement liquide et tamponné avec un phosphate alcalin.

Un peu plus tard, DESCHIENS qui a poursuivi ses études sur le pH des milieux, précise définitivement les conditions d'acidité ionique et les différentes phases de son évolution dans les milieux renfermant du sérum et de l'amidon.

La culture de l'amibe dysentérique est alors devenue chose aisément réalisable, et dans leurs modifications, les auteurs se montrent de plus en plus soucieux d'adapter leurs techniques à une étude plus sélective des divers aspects de la biologie de l'amibe et à la possibilité d'une recherche pharmacologique.

Nous n'insisterons pas ici sur toutes les variantes préconisées ; celles-ci sont extrêmement nombreuses. Pour les principales d'entre elles, nous avons d'ailleurs réservé un exposé plus détaillé dans le paragraphe suivant.

Notons seulement ici, pour la continuité de notre historique, l'apparition plus fréquente de formules simplifiées et de milieux de culture entièrement liquides ; les principaux auteurs en sont : CRAIG (1926), LAIDLAW, DOBELL, SAINT JOHN (1933), SANDZA (1944), CHANG (1945), HANSEN (1945), HITHCOOK et RAWSON, BALAMUTH (1946), PAVLOVA, DOLKART et HALPERN (1958).

Les travaux s'orientent aussi vers l'étude du métabolisme des amibes et de leur virulence en culture ; les auteurs cherchant à découvrir des facteurs de croissance, et par là même essayant de comprendre le phénomène des variations du pouvoir pathogène.

DOPTER et DESCHIENS, en 1938, montrent ainsi que la bilirubine figurée ou en solution, au titre de 2 ou 4 millièmes, est une source de facteurs de croissance dans les cultures ; tandis que la bile totale ne joue aucun rôle.

DASPECT et JONCHÈRES observent également que l'addition dans le milieu de culture de solutions faibles d'hémoglobine est favorable au développement des amibes.

Depuis les travaux de SNYDER et MELEYEY (1943), REES et coll. (1944), HANSEN et ANDERSON (1948), SHARMA, SINGH [84], BIAGI et ROBLEDO [6], il ressort aussi que le cholestérol est un facteur de croissance pour l'amibe ; et même, selon certains auteurs, il serait un principe régénérateur de la virulence pour les amibes de culture (SINGH, BIAGI et ROBLEDO).

Cependant, de récentes expériences de CEDILLOS, REEVES, SWARTZWELDER [19] ne confirment pas ce résultat.

En définitive, la nature et le rôle des facteurs de croissance de l'amibe et des éléments agissant sur sa virulence ne sont que partiellement connus et, à l'heure actuelle, la question fait encore l'objet de travaux nombreux.

Nous ne citerons que brièvement les recherches suscitées par la culture de l'amibe à partir de kystes, et les différentes méthodes proposées pour provoquer l'enkystement des amibes en culture.

Dès 1928, DOBELL avait obtenu l'enkystement artificiel et mis au point, en 1931, une méthode de culture discontinue pour la conservation plus ou moins prolongée des amibes.

Depuis lors, de nombreuses méthodes ont été proposées par YORKE et ADAMS, TSUCHIVA, PICK, DESCHIENS et LAMY, ZYKERMANN et MELENEY par exemple.

Le rôle des bactéries dans les milieux de culture est encore un autre point qui depuis longtemps inspire beaucoup de travaux ; ceux-ci sont effectués le plus souvent dans le but d'élucider des questions de biologie, de virulence ou de réaliser la culture pure.

L'association monogermine a déjà rendu possible la culture de l'amibe dysentérique ; les bactéries qui se sont révélées les plus favorables à ce point de vue sont : *Escherichia coli*, les *Para coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Clostridium perfringens*.

En 1953, PHILLIPS a même obtenu la culture d'amibes sans bactéries, mais en substituant à celles-ci un flagellé : *Trypanosoma cruzi*.

Jusqu'à l'heure présente, par contre, l'on ne possède pas encore la technique permettant la culture pure d'*Entamoeba dysenteriae* ; celle-ci en est encore à un stade expérimental. De récents travaux, cependant, faisant intervenir des procédés minutieux de micromanipulation de kystes et de microcultures, sont riches de promesse (REES, KEY, SHAFFER [73] ; REES [72]). Mais l'amibe dysentérique pourra-t-elle se passer définitivement de ses bactéries associées ?

En guise de conclusion à cet exposé historique, nous pouvons donc dire que, de nos jours, la mise en culture et la culture de l'amibe dysentérique ne posent pratiquement plus de problèmes. L'on dispose, en effet, d'une telle variété de techniques, que la difficulté résiderait plutôt dans le juste choix de la méthode la plus convenable à l'étude que l'on se propose d'effectuer.

Des recherches dans ce domaine restent cependant d'actualité ; car on sait combien la culture offre de possibilités pour l'étude de la morphologie, de la biologie, du métabolisme des amibes et de leur pouvoir pathogène, qui sont loin d'avoir livré tous leurs secrets.

II. — LES METHODES DE CULTURE D' "ENTAMŒBA DYSENTERIÆ"

Un coup d'œil sur l'historique de la culture de l'amibe dysentérique nous a permis de reconnaître à BOECK et DRBOHLAV le mérite de la mise au point des premières techniques permettant la culture véritable de cette amibe.

Une brève étude de la chronologie des travaux qui suivirent nous a montré aussi combien fut grand, dans le monde entier, l'intérêt que suscita cette découverte et nous a révélé, en partie, les diverses applications que déjà devait connaître la culture d'*Entamœba dysenteriae*.

Ainsi l'étude de l'action amœbicide des substances sur *Entamœba dysenteriae* en culture, l'étude de sa biologie, ou tout simplement le désir de réaliser l'ensemencement et l'entretien des souches d'amibes au laboratoire furent autant de raisons qui, de plus en plus, imposèrent aux auteurs l'obligation de posséder des techniques bien adaptées, perfectionnées et qui leur permettraient de satisfaire aux deux impératifs suivants :

1° Obtenir des cultures abondantes, sur des milieux de préparation simple et commode.

2° Augmenter la longévité des cultures, partant en faciliter l'entretien, en réduisant la fréquence des repiquages.

De plus, la connaissance plus précise, voire la découverte des facteurs influençant la culture de l'amibe, comme l'évolution du pH, la composition et le rôle de la flore associée, l'influence des éléments figurés, amenèrent également les chercheurs à apporter de nombreuses modifications aux techniques de BOECK et DRBOHLAV et, dans bien des cas, à présenter de nouveaux milieux de culture.

Dans ces conditions, nous comprenons facilement les raisons qui firent imaginer un si grand nombre de milieux de toutes sortes :

- milieux à l'œuf ;
- milieux gélosés ;
- milieux au sérum coagulé ;
- milieux monophasiques ;
- milieux simplifiés.

Des principaux milieux mis au point jusqu'à ce jour, nous donnons dans le premier paragraphe une rapide présentation et un exposé des techniques de préparation. Nous avons trouvé chez LANGERON [56], nos renseignements sur les milieux les plus classiques.

Puis, dans les deux paragraphes suivants, nous étudions en détail trois milieux particuliers que nous avons choisis et dont nous avons personnellement éprouvé les qualités pratiques durant nos travaux. A propos de ces milieux et à la lumière de l'expérience que nous en avons obtenue, nous insisterons sur l'importance pratique de facteurs bien connus, comme :

- la durée de la culture ;
- la température ;
- le pH ;
- la flore associée ;
- le rôle de l'amidon de riz et des éléments figurés divers.

Le dernier paragraphe de ce chapitre est consacré au cycle de développement et à la morphologie de l'amibe de culture.

Finalement, nous concluons notre chapitre des cultures sur des remarques et appréciations personnelles concernant ces trois principaux milieux.

A. — MILIEUX A L'ŒUF COAGULÉ

• *Milieu de Dorset*

Préparation :

1° Dans un flacon à large goulot, garni de billes de verre, verser le contenu total de trois œufs frais et ajouter 30 ml de solution de Ringer. Opérer avec le maximum d'asepsie (verrerie stérilisée, coquilles des œufs lavées au savon et passées à l'alcool, de même pour les mains de l'opérateur). Flamber légèrement le pôle de l'œuf opposé à celui de la chambre à air, le percer avec une pointe également flambée et le poser sur le goulot du flacon. Percer le pôle de la chambre à air, et souffler pour faire couler le contenu de l'œuf.

2° Emulsionner à l'aide des billes de verre, par agitation du flacon.

3° Répartir à raison de 2 ml environ dans des tubes stérilisés.

4° Faire coaguler, en tubes inclinés, par chauffage à 75°C pendant une heure (dans une étuve à coaguler). Toute la masse et les bulles d'air doivent disparaître et la coagulation doit être totale.

5° Après refroidissement, recouvrir la couche inclinée d'œuf coagulé avec du liquide ovomucoïde.

Remarque :

Les tubes ne renfermant que la phase solide peuvent être aisément conservés à la glacière jusqu'au moment de l'emploi.

- *Liquide ovomucoïde. Boeck*

Dans un récipient (flacon, ballon) garni de billes de verre et stérilisé, faire tomber un blanc d'œuf recueilli aseptiquement et ajouter progressivement 1 litre de liquide de Ringer stérilisé, tout en agitant.

- *Milieu de Locke œuf sérum (L.E.S.). Boeck*

La préparation s'effectue comme dans le milieu de Dorset, mais comporte en plus, ici, une stérilisation à l'autoclave.

1° Dans un récipient garni de billes de verre et stérilisé, émulsionner le contenu total de quatre œufs frais avec 50 ml de liquide de Locke (voir plus loin : liquides physiologiques).

2° Répartir en tubes.

3° Coaguler par chauffage à 75°C.

4° Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes.

5° Recouvrir avec la phase liquide constituée par du sérum humain (inactivé et stérile), dilué dans la proportion d'une partie pour huit parties de liquide de Locke.

- *Milieu Locke œuf albumine (L.E.A.). Boeck et Drbohlav*

Ce milieu ne diffère du précédent que par la composition de la phase liquide qui est ici du liquide ovomucoïde préparé avec du liquide de Locke.

Le blanc d'œuf peut être remplacé par 10 g d'albumine cristallisée.

- *Milieu Locke œuf sang (L.E.B.). Kofoed et Mc Neil*

Ce milieu est identique au milieu de BOECK et DRBOHLAV (L.E.A.) et n'en diffère que par la phase liquide constituée comme suit :

— Liquide de Locke	500 ml
— Sang frais (défibriné) de lapin ..	2,5 ml

• *Milieu de Deschiens (1927)*

Ce milieu réalise une modification et aussi une simplification du milieu de BOECK et DRBOHLAV (œuf Locke, Ringer albuminé).

DESCHIENS remplace le Ringer du milieu solide DORSET, ainsi que le liquide Locke-Ringer albuminé de la phase liquide, par de l'eau salée à 7 p. 1.000 albuminée et dont le pH se situe entre 7,2 et 7,6.

Le milieu est alors constitué comme suit (dans des tubes de 10 mm de diamètre intérieur) :

- plan incliné solide : 2 ml de liquide de DORSET coagulés à 75°C pendant une heure ;
- phase liquide de recouvrement : 1 à 2 ml d'eau salée albuminée (blanc d'œuf à 10 p. 100 environ) ;
- amidon de riz.

Ce milieu est à rapprocher de celui de CRAIG (1926) qui a permis à son auteur de cultiver l'amibe dans une phase liquide, composée de 7 parties d'eau physiologique pour 1 partie de sérum inactivé.

• *Milieu de Balamuth [1, 2]*

Ce milieu, qui est un de ceux que nous avons spécialement étudiés, a pour base : une infusion de jaune d'œuf, une solution de poudre de foie et un tampon phosphaté.

Nous l'exposerons en détail plus loin.

B. — MILIEUX GÉLOSÉS

Ces milieux présentent sur les précédents l'avantage d'une préparation plus facile.

Dans les trois premiers milieux suivants, la gélose constitue l'élément de base de la phase solide ; aussi, après sa stérilisation à l'autoclave et sa solidification en plan incliné, on la recouvre de liquide ovomucoïde.

• *Gélose salée Drbohlav*

Deux modes de préparation :

1° Dissolution de 14 g de gélose dans un litre d'eau salée à 6 p. 1.000.

2° Dissolution de 14 g de gélose dans un litre de solution de Ringer additionné de 0.5 p. 100 de phosphate monopotassique comme (pH = 7,4) stabilisateur de pH.

- *Gélose amidonnée*

C'est le milieu précédent additionné de 1 p. 100 d'amidon.

- *Gélose au sang chauffé*

A un milieu solidifié de gélose salée pour milieu N.N.N., soit constitué d'environ 2 à 3 ml du mélange :

— Eau ordinaire	900 g
— Gélose	14 g
— Sel marin	6 g

On ajoute (technique de MATHIS) un ou deux volumes de sang défibriné, de bœuf ou de cheval.

Technique :

Par chauffage à 100°C, on provoque la liquéfaction de la gélose, que l'on refroidit ensuite vers 50°C ; puis, après addition et mélange avec les volumes de sang, on fait coaguler en couche inclinée. Finalement, on stérilise pendant 15 minutes à l'autoclave.

Remarques :

A la fin de l'opération, il reste un peu d'eau de condensation au fond du tube, et la chose est normale.

Ce milieu est également appelé milieu « *chocolat* » en raison de la couleur que prend le sang quand il est cuit.

- *Milieu de Tanabe et Chyba à l'asparagine (1928)*

La composition du milieu est la suivante :

1° Support solide : faire dissoudre à l'autoclave 1 p. 100 de gélose dans une solution de Ringer, puis filtrer sur flanelle : à ce filtrat, ajouter 0,1 p. 100 d'asparagine ; répartir en tubes et stériliser.

2° Partie liquide : recouvrir la phase solide avec du liquide de Ringer renfermant 5 p. 100 de sérum de lapin.

3° Aliment figuré : au moment de l'emploi, ajouter 2 ou 3 anses d'amidon de riz.

Sur ce milieu, la longévité moyenne des cultures est de 10 à 14 jours : les amibes se développent abondamment à partir du troisième jour.

Le pH initial est assez alcalin : 7,8, et il tombe à 6,4 vers le quatrième jour et à 5,6 vers la fin de la culture.

• *Milieu de Deschiens et Chipchidze* [30]

Les milieux à base de gélose étant peu nutritifs et peu favorables à la pullulation microbienne, les auteurs ont tenté, en utilisant cette gélose comme point de départ, de préparer un milieu permettant d'obtenir une plus grande longévité moyenne des cultures.

La composition du milieu est la suivante :

1^o Partie solide (5 ml par tube) constituée par un mélange :

— Gélose	20 g
— ClNa	5 g
Extrait de bœuf	2,5 g
— Eau distillée	1.000 ml

et préparée selon la technique ordinaire de la préparation de la gélose nutritive. Solidifier en tubes inclinés. Le pH du milieu doit être aux environs de 7 et ne doit pas dépasser ce chiffre vers l'alcalinité.

2^o Partie liquide (5 ml par tube) : solution de Ringer ou eau physiologique à 6 p. 1.000 : pH 7-7,6.

a) Poudre de poisson ou poudre de bœuf stérilisée.

b) Amidon de riz stérilisé (0,02 g environ par tube).

Les auteurs ont pu cultiver *E. dysenteriae* sur ce milieu, mais également *E. coli*, *E. gingivalis* et une amibe de l'intestin du singe.

La durée moyenne de la culture étant de dix jours, les repiquages doivent être effectués tous les huit jours ; on obtient des cultures riches à partir du troisième jour.

Comme les milieux du type DOBELL (sérum de cheval, Ringer ovomucoïde albuminé, amidon), ce milieu traverse deux phases successives au cours de son évolution :

- une fermentation butyrique de l'amidon ;
- une putréfaction des albumines.

Ici cependant, le processus de fermentation s'effectue lentement et permet ainsi un état d'équilibre du pH favorable pendant dix jours.

• *Milieu de Cleveland et Collier*

Ce milieu renferme les trois éléments classiques des milieux de culture, mais pratiquement, il ne peut être préparé qu'industriellement.

1° Partie solide : gélose à l'infusion de foie.

2° Liquide de recouvrement : une partie de sérum de cheval pour six parties de Ringer.

3° Amidon de riz.

Les auteurs disent avoir obtenu de très belles cultures grâce à ce milieu ; le milieu serait presque spécifique pour *E. dysenteriae*, il conviendrait aussi à *Dientamoeba fragilis*, mais nullement à *E. coli*, ni à *Endolimax nana* ou *Pseudolimax butschlii*.

C. — MILIEUX AU SÉRUM COAGULÉ

• *Milieu de Dobell et Laidlaw (1926)*

Ces auteurs ont été les premiers à utiliser le sérum de cheval coagulé, comme phase solide.

La composition du milieu est la suivante :

1° Partie solide : sérum de cheval coagulé, en couche inclinée.

2° Partie liquide : liquide ovomucoïde, préparé avec quatre blancs d'œufs pour un litre de solution de Ringer.

3° Aliment figuré : amidon de riz.

• *Milieu de Simitch (1930)*

Dans ce milieu, la partie solide est constituée par du sérum glycosé de LOEFFLER ; la phase liquide est la solution de Ringer, et l'aliment figuré, l'amidon de riz.

La préparation du sérum de Loeffler s'opère de la façon suivante :

1° Préparer le bouillon glucosé selon la technique bactériologique :

— Eau	1.000 ml
— Viande de bœuf	500 g
— Peptone	20 g
— ClNa	5 g
— Glucose	10 g

Alcaliniser très légèrement avec de l'hydroxyde de sodium.

2° Mélanger une partie de bouillon et trois parties de sérum de cheval ou de bœuf.

3° Répartir en tubes et coaguler à 70°-75°C.

• *Milieu de Deschiens (1938)*

Ce milieu est le résultat d'une modification du milieu précédent de DOBELL et LAIDLAW.

DESCHIENS conserve le sérum coagulé, mais le recouvre de sérum de cheval étendu de 6 parties de Ringer ; l'aliment figuré est l'ami-don de riz, et l'auteur lui ajoute 2 cg de bilirubine (par tube), en fins cristaux, dont l'action favorisante lui semble certaine.

Nous reviendrons plus en détail sur ce milieu de culture, car il constitue à peu de choses près celui que nous avons adopté comme milieu étant le plus favorable à l'entretien de nos souches.

D. — MILIEUX LIQUIDES

L'eau physiologique.

Le liquide de Ringer.

Le liquide de Locke, ne constituent pas, à vrai dire, des milieux de culture ; mais ils en sont, en général, les constituants essentiels.

Ils permettent une conservation des amibes allant de vingt-quatre à quarante-huit heures (vers une température de 37°C).

• *Milieux de Craig (1926)*

CRAIG présente deux compositions fort simples, sur lesquelles il a obtenu des cultures d'amibes.

Milieu 1 :

— Liquide de Locke ou Ringer	7 parties
— Sérum humain inactivé	1 partie

Le milieu de Ringer, utilisé par CRAIG, a la formule suivante :

— ClNa	8 g
— Cl ₂ Ca	0,2 g
— ClK	0,2 g
— Eau distillée	1.000 ml

Milieu 2 :

— Eau physiologique	7 parties
— Sérum humain inactivé	1 partie

Certes, ces milieux ne réalisent pas les meilleures conditions pour une culture régulière et constante : dans la majorité des cas, en effet, les amibes n'y survivent que pendant quelques repiquages. Cependant, ils sont intéressants à noter, car ce furent les premiers à présenter l'avantage de ne renfermer que des constituants très simples comme l'eau physiologique, le liquide de Ringer et le sérum.

Utilisant un milieu très voisin du milieu 1 de CRAIG, mais additionné d'amidon de riz, nous avons pu obtenir personnellement de très bonnes et régulières cultures.

Le milieu était constitué de la manière suivante :

— Liquide de Ringer (formule usuelle avec CO_3HNa_3)	5 parties
— Sérum de cheval stérile	1 partie

Le pH de départ était voisin de 7,2 ; nous répartissions à raison de 5 cm³ par tube.

Pour la culture de *Trichomonas foetus*, L. LAMY [54] avait préconisé un milieu analogue ; mais ce milieu ne renfermait que 1/7^e de sérum de cheval ; pour la culture de l'amibe, la concentration supérieure de 1/5^e nous est apparue plus favorable.

Repiquages tous les trois ou quatre jours.

- *Milieu de Laidlaw, Dobell et Bishop (1928)*

Ce milieu est constitué par une dilution de sérum de cheval dans du liquide de Ringer (1 partie pour 8 parties). Il est additionné d'amidon de riz et tamponné à pH 7,2-7,4 à l'aide d'une solution de phosphate disodique à 0,2 p. 100.

- *Milieu de H. Saint John (1933)*

Ce milieu a pour base la poudre de cœur de bœuf. Comme le milieu de CLEVELAND et COLLIER, il nécessite généralement une préparation industrielle. Elle consiste à faire bouillir de la poudre de cœur de bœuf pendant une heure dans du liquide de Locke.

L'aliment figuré est la farine totale de blé.

- *Milieu de Balamuth [1, 2]*

Ce milieu, déjà présenté à l'occasion des milieux à l'œuf, est décrit en détail dans le paragraphe suivant.

• *Milieu de Pavlova* [66, 48]

Le milieu fut présenté par PAVLOVA (1938) et modifié par JONES, en 1952. C'est le troisième des trois milieux que nous avons particulièrement étudiés. Nous lui avons réservé un exposé spécial dans le paragraphe suivant.

• *Milieu de Reeves, Meleney et Frye (M.S.F.)* [74]

Le milieu comprend une composition de base, à laquelle on ajoute, après autoclavage, du sérum de cheval et de la pénicilline.

Le milieu de base a la composition suivante (en g par litre) :

— Trypticase	20 g
— Glucose	10 g
— Chlorure de sodium	2,5 g
— Phosphate dipotassique	1,5 g
— Chlorure de cystéine	0,79 g
— Acide mercaptosuccinique ...	1,5 g
— Lessive de soude	pH 7,0 $\pm$ 0,1

Répartir à raison de 12 ml par tube ; autoclaver à 121°C pendant dix minutes.

Au moment de l'ensemencement des amibes, introduire dans chaque tube 0,25 ml de sérum de cheval stérile, 5.000 U de pénicilline G et 0,2 ml de suspension de bactéries (certaines cultures reçoivent en plus 5 mg de sulfate de streptomycine dans 0,25 ml d'eau).

Mettre à l'étuve à 37°C pendant quarante-huit ou soixante-douze heures.

• *Milieu de Dolkart et Halpern* [37]

Ce milieu a pour base la poudre de mucine gastrique. Sa préparation s'effectue de la façon suivante :

1° Préparer une *solution stock de mucine* :

— Poudre de mucine gastrique	5 g
Eau distillée	100 ml

Autoclaver pendant quinze minutes.

Refroidir et centrifuger quinze minutes à 2.000 tours.

Recueillir le liquide surnageant qui constitue la solution stock de mucine.

Deux manières d'utilisation de cette solution.

a) *Milieu A* : diluer la solution stock de mucine au 1/100^e avec de l'eau salée à 8 p. 1.000 et, dans chaque tube de culture à 2,5 ml de la solution obtenue, ajouter 0,5 ml de milieu de BALAMUTH.

b) *Milieu B* : comme précédemment, diluer au 1/100^e la solution stock de mucine, mais ici avec une solution M/15 ou M/30 de PO_4HK_2 et $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ renfermant 8 p. 1.000 de ClNa .

2^o Répartir ces différents milieux à raison de 3 ml par tube de culture et ajouter au moment de l'emploi une pincée d'amidon de riz.

L'auteur a obtenu de bons résultats avec ces milieux : toutefois, le milieu B, M/15 semble moins favorable que les deux autres.

La suppression de la mucine rend la culture impossible, ce qui démontre l'absolue nécessité de ce produit.

III. — TROIS MILIEUX CHOISIS

Nous présentons ici trois milieux de culture pour l'amibe dysentérique, à savoir :

- un milieu diphasique ;
- et deux milieux monophasiques.

Grâce à ces milieux, depuis plus de trois ans, nous avons pu régulièrement et facilement entretenir les différentes souches qui nous ont servi dans nos expériences.

Dans le paragraphe suivant, réservé à la conduite de la culture, nous exposons les détails techniques relatifs à l'utilisation pratique de ces milieux.

A. — MILIEU DIPHASIQUE MILIEU N DE L'INSTITUT PASTEUR

Ce milieu n'est autre que celui de DOBELL et LAIDLAW (1926) qui fut modifié par DESCHIENS, en 1938.

Constitué selon la règle classique, il comprend trois éléments : un support solide, une phase liquide et un aliment figuré.

PREPARATION

• *Préparation des éléments constitutants*

1) LE SUPPORT SOLIDE : sérum de cheval coagulé

Dans des tubes 16-17 × 170 mm, introduire 2 ml de sérum de cheval et faire coaguler à 85°C en position inclinée (dans un coagulateur).

-- *Remarque* : l'inclinaison des tubes doit permettre une répartition du sérum sur une hauteur de 4 à 5 cm.

Une fois la coagulation obtenue, les tubes sont conservés à la glacière.

2) PHASE LIQUIDE : liquide de Ringer, solution de bicarbonate, sérum de cheval, amidon de riz

Pratiquement, nous en effectuons la préparation en plusieurs temps.

a) *Solution de Ringer :*

— ClNa	6 g
— ClK	0,1 g
— Cl_2Ca	0,1 g
— Eau distillée	1.000 ml
	pH $7,4 \pm 0,2$

Préparer à l'avance une solution mère de Ringer (10 fois plus concentrée); conserver au frigidaire.

Au moment de l'emploi, préparer le volume désiré de solution de Ringer normal, et stériliser à 120° pendant vingt minutes.

b) *Solution de bicarbonate à 0,2 p. 100 :*

— Bicarbonate de sodium	2 g
— Eau distillée	1.000 ml

Répartir en ampoule scellées, à raison de 5 ml par ampoule, et stériliser vingt minutes à 120° .

— *Remarque :* la stérilisation du bicarbonate ne peut être effectuée qu'en ampoules scellées, ceci pour éviter sa dissociation. En conséquence, le bicarbonate ne doit pas être ajouté dans le milieu qu'en fin d'opération, comme il est dit plus loin ; on évite ainsi d'une part la réaction avec le Cl_2Ca , et d'autre part la perte de CO_2 au cours de l'autoclavage.

c) *Sérum de poulain stérile* (ampoules de 50 ml fournies par l'Institut Pasteur).

3) AMIDON DE RIZ

Répartir à raison de 2 g dans de petits tubes bouchés au coton et stériliser par tyndallisation au four à $140^\circ\text{--}160^\circ\text{C}$ pendant une heure, trois jours consécutifs.

• *Mélange des constituants et mise en tubes*

a) Dans des erlenmeyers de 250 ml, préalablement stérilisés, introduire 150 ml de liquide de Ringer et stériliser à 120°C pendant vingt minutes. Il y a avantage à effectuer cette opération à l'avance, et à conserver ainsi à la glacière des flacons de liquide de Ringer stérilisés.

b) Ajouter dans les erlenmeyers, aseptiquement :

- 1 ampoule de solution de CO_3HNa_2 (5 ml)
- le contenu du tube d'amidon de riz stérilisé (environ 2 g)
- 20 ml de sérum de cheval stérile

On obtient ainsi environ 175 ml de phase liquide, contenant l'amidon en suspension.

c) Répartir dans les tubes de sérum coagulé, à raison de 4 ml par tube (utiliser la seringue à répartition stérilisée et agiter constamment la phase liquide pour maintenir l'amidon en suspension).

Conserver les tubes à la glacière et porter à 37°C avant l'ensemencement.

B. — PREMIER MILIEU MONOPHASIQUE : MILIEU DE BALAMUTH [1, 2]

Ce milieu a pour base une infusion de poudre de jaune d'œuf, une solution de poudre de foie, et est tamponné avec une solution phosphatée.

L'auteur, en Amérique, utilisant pour sa préparation des produits d'origine industrielle, et par conséquent d'obtention peu commode, nous n'exposerons donc ici que la technique de préparation que nous avons effectivement utilisée pour obtenir ce milieu.

PREPARATION

• *Les éléments constitutants*

1) PRÉPARATION DE L'INFUSION DE JAUNE D'ŒUF

a) Faire durcir quatre œufs très frais, en les chauffant pendant quinze minutes à l'ébullition. Casser les coques et séparer les blancs des jaunes. Ecraser les jaunes et leur ajouter progressivement 125 ml de ClNa à 8 p. 1.000 tout en agitant vigoureusement (agitateur mécanique). Faute d'agitateur mécanique, une trituration prolongée, dans un mortier, permet de réaliser cette première opération.

Il s'agit d'éviter la formation de grumeaux et d'obtenir un mélange parfait.

b) Dans une capsule, garnie de grosses billes de verre, chauffer le précédent mélange dix minutes à l'ébullition en agitant constamment. Après l'ébullition, compenser l'évaporation en ajoutant de l'eau distillée (environ 20 ml suffisent).

Il est possible également de chauffer sans billes de verre, mais au bain-marie et dans un flacon bouché, pendant vingt minutes comptées à partir du moment où la température atteint 80°C.

c) Passer sur double flanelle (ou mousseline ou gaze) en exprimant pour obtenir 90 à 100 ml d'un liquide jaunâtre. Compléter à 125 ml avec de l'eau salée à 8 p. 1.000.

d) Stériliser cet extrait à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes ; il se sépare alors un sédiment jaune.

e) Refroidir vers + 10°C et filtrer sur un entonnoir de Büchner garni de plusieurs épaisseurs de papier filtre jusqu'à obtention d'un liquide clair (l'opération est lente, le filtre se colmatant facilement).

2) PRÉPARATION DE LA SOLUTION TAMPON : à effectuer au moment de l'emploi

a) Préparer les solutions A et B suivantes :

- A : solution M de PO_4HK_2 , soit 174,180 g pour 1.000 ml d'eau distillée
- B : solution M de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, soit 136,092 g pour 1.000 ml d'eau distillée

b) Préparer la solution *stock M*, en mélangeant :

- 4,3 parties de la solution A
- 0,7 partie de la solution B

c) Finalement, obtenir la *solution M/15* en ajoutant, à 1 partie de la solution stock M, 14 parties d'eau distillée.

3) PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE POUDRE DE FOIE

a) Dans un petit ballon à large goulot et garni de billes de verre, porter à l'ébullition, pendant cinq minutes, le mélange suivant :

- Poudre de foie DIFCO 5 g
- Eau distillée 100 ml

b) Filtrer sur papier et coton et stériliser à l'autoclave pendant vingt minutes à 120°C.

• *Mélange des constituants et répartition en tubes*

Le mélange s'effectue dans la proportion suivante :

a) Ajouter, au liquide clair d'infusion d'œuf, partie égale de tampon phosphaté, et au volume ainsi obtenu, son 1/9^e de solution de poudre de foie.

b) Répartir à raison de 4,5 ml par tube.

c) Stériliser les tubes à 120°C pendant vingt minutes, à l'autoclave.

Conserver les tubes à la glacière.

Au moment de l'emploi, ajouter dans chaque tube une pincée d'amidon et porter à 37°C avant l'ensemencement.

C. — DEUXIÈME MILIEU MONOPHASIQUE : MILIEU DE PAVLOVA [66, 48]

Ce milieu est d'une préparation extrêmement simple qui s'effectue de la façon suivante :

COMPOSITION

— PO_4HNa_2	4,45 g
— PO_4HK_2	1,135 g
— ClNa	20 g
— Extrait de levure Difco	2,75 g
— Eau distillée	2.750 ml

Le milieu comprend en outre 5 p. 100 de sérum de cheval stérile.

PREPARATION

a) Faire dissoudre séparément les différents produits dans l'eau distillée (chauffer légèrement pour aider la dissolution de l'extrait de levure). Réunir les solutions dans un grand ballon et ajouter l'eau distillée en totalité.

b) Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes.

c) Laisser refroidir et ajouter aseptiquement :

- 5 p. 100 de sérum de cheval stérile
- l'amidon de riz stérilisé, à raison de 2 grammes environ pour 200 ml de milieu

d) Répartir aseptiquement dans les tubes de cultures à raison de 4,5 ml par tube (utiliser une seringue à répartition stérilisée, et agiter constamment la phase liquide pour maintenir l'amidon en suspension.

Le pH final doit être voisin de 7,1-7,2. Conserver les tubes à la glacière. Au moment de l'emploi, les porter à 37°C pour l'ensemencement.

IV. — CONDUITE DE LA CULTURE ET FACTEURS INFLUENCANTS

A. — ENSEMENCEMENTS ET REPIQUAGES

Pour réaliser un ensemencement, le point de départ des cultures peut être soit les formes végétatives, soit les kystes.

Nous n'envisagerons ici que l'ensemencement à partir des formes végétatives, et ne parlerons pas de celui, à partir des kystes, qui nécessite une technique spéciale permettant le dékystement, et dont nous n'avons pas personnellement l'expérience.

A) PRELEVEMENT EN ENSEMENCEMENT

1) A PARTIR DES SELLES :

A l'aide d'une petite anse métallique emmanchée, on pique en plusieurs points de la selle, de préférence dans les parties muco-sanglantes, en prélevant gros comme un petit pois de matières ; on porte alors dans le fond d'un tube de culture, préalablement chauffé à 37° ; on agite légèrement l'anse au contact de l'amidon et, le tube bouché, on porte à l'étuve à 37°.

En raison de la pollution certaine et rapide due à ce premier prélèvement, il est nécessaire d'effectuer plus fréquemment les trois ou quatre repiquages suivants, soit tous les deux jours environ.

2) A PARTIR D'UNE CULTURE :

L'opération prélèvement-ensemencement s'identifie alors au simple « repiquage » d'un milieu usé dans un milieu neuf. Mais dans ce deuxième cas, il peut s'agir aussi du transport des amibes, d'un milieu de culture donné dans un autre de composition différente : l'opération, en cette occurrence, s'effectue aussi par repiquage ; mais ici, la bonne conduite ultérieure de la culture, quand celle-ci est possible,

nécessite le plus souvent des précautions particulières, dont un repiquage fréquent et attentif constitue généralement la plus sûre.

Nous reviendrons un peu plus loin sur cette question du « transport » des amibes, de l'un à l'autre des trois milieux que nous avons utilisés.

— *Technique du repiquage* : à l'aide d'une pipette stérile, type pipette Pasteur, finement étirée et sectionnée à son extrémité après passage dans la flamme, on aspire un peu du liquide et du dépôt d'amidon dans le fond du tube renfermant les amibes ; on ensemence ce prélèvement dans le fond d'un tube neuf, en agitant légèrement, et on porte à l'étuve à 37°C.

Pour faire le prélèvement, il est commode de se servir d'un tube de Helmotz, que l'on ajuste à la pipette Pasteur. Ce dispositif consiste en un petit tube de verre, de 10 cm environ, obstrué par du coton à une extrémité, l'autre extrémité étant reliée à un tube en caoutchouc de 10 à 30 cm de long.

B) OBSERVATION MICROSCOPIQUE

On fait un prélèvement dans le fond du tube en grattant doucement et on dépose 1 à 2 gouttes de ce prélèvement sur une lame préalablement chauffée vers 37°C (sur une plaque chauffante ou dans une étuve de Foot); on recouvre d'une lamelle et on examine au microscope.

— Pour observer au microscope ordinaire les amibes vivantes et bien mobiles, il faut opérer rapidement, car, au bout de quelques minutes, l'abaissement de la température provoque un ralentissement des mouvements des amibes, qui prennent alors la forme arrondie ; à ce stade, un court passage de la lame dans l'atmosphère chaude d'une flamme permet encore de stimuler les mouvements.

— A l'étuve de Foot, pour permettre une observation prolongée des amibes, il est préférable de luter les préparations à la paraffine : ceci pour éviter leur dessiccation qui entraînerait la mort des amibes.

Nous avons également utilisé le procédé suivant qui, en retardant la dessiccation, nous a permis une observation prolongée des amibes.

Sur une lame de verre, nous plaçons un petit carré de papier filtre, préalablement humecté du liquide et présentant en son centre une ouverture circulaire de 10 mm de diamètre environ : c'est au centre de ce petit cercle que nous déposons la goutte de prélèvement. L'observation s'effectue ensuite après recouvrement avec une grande lamelle (18 × 24 mm).

C) REPIQUAGE ET FREQUENCE DES REPIQUAGES

Comme nous l'avons vu, le repiquage est l'opération qui consiste à prélever des amibes d'un milieu de culture usé, pour les ensemercer dans un milieu neuf ; ceci ayant pour but d'assurer la pérennité de la culture.

La fréquence du repiquage est fonction de l'évolution plus ou moins rapide du milieu de culture ; différents facteurs, particuliers à chaque milieu, comme la température, les phénomènes de fermentation, la flore associée, déterminent, ainsi que nous le verrons, la durée de cette évolution.

En ce qui concerne nos trois milieux, nous avons effectué normalement nos repiquages tous les quatre ou cinq jours. Néanmoins, nous avons pu déterminer les fréquences de repiquage, soit les durées de culture, optimales pour chacun de ces milieux ; et elles sont respectivement de :

- trois-quatre jours pour le milieu diphasique ;
- trois-quatre jours pour le milieu de BALAMUTH ;
- quatre-cinq jours pour le milieu de PAVLOVA.

En conséquence, vu le rythme de repiquage adopté, le milieu de PAVLOVA fut celui qui s'en est trouvé le mieux et qui, de ce fait, a nécessité généralement le moins d'attentions particulières.

Rappelons, à titre d'exemple, que d'autres milieux permettent des repiquages plus espacés ; ce sont ceux de :

- DESCHIENS-CHIPCHIDZE (tous les huit jours) ;
- TANABE et CHIBA (tous les dix jours).

Nous les avons déjà présentés.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

A plusieurs reprises, au cours de nos recherches, nous avons éprouvé quelques difficultés pour implanter certaines souches d'*E. dysenteriae* sur nos milieux. Le plus souvent, il s'agissait de souches d'amibes reçues en cultures sur un milieu du type diphasique.

Dans ces conditions, si le repiquage sur un milieu diphasique analogue n'a généralement pas présenté de difficultés, en ce qui concerne les deux autres milieux, en revanche, l'opération fut plus délicate car le problème posé était celui du *transport* de la culture, c'est-à-dire son passage d'un milieu donné dans un autre différent.

Dans ces cas de « transport » qui d'ailleurs ont toujours fini par être réalisés, c'est d'abord au procédé des repiquages fréquents que nous avons eu recours ; ils furent effectués tous les deux jours, voire tous les jours, pendant trois ou quatre repiquages.

Par la suite, nous avons adopté un autre artifice : à partir d'une belle culture sur milieu diphasique, nous ensemencions, quotidiennement à trois ou quatre reprises, un même tube de milieu de BALAMUTH ou PAVLOVA ; de cette manière, nous obtenions vers le cinquième jours, des amibes adoptées dans le nouveau milieu. Les repiquages habituels assuraient ensuite la continuité de la culture.

— *Remarque* : si, comme nous l'avons laissé entendre, le transport des amibes d'un milieu diphasique dans un milieu monophasique (milieux de BALAMUTH ou de PAVLOVA) a régulièrement présenté quelques difficultés, le transport inverse, au contraire, a toujours pu être réalisé avec la plus grande facilité.

En d'autres occasions, également, nous avons été contraints d'effectuer des repiquages très fréquents, et ce furent celles où nous avons constaté une défaillance de nos cultures, le plus souvent déterminée par un envahissement trop rapide et abondant des bactéries associées. Dans ces cas, nous cherchions à réduire autant que possible la contamination en ensemençant, au moment du repiquage, un très faible prélèvement fait au niveau de l'amidon.

Un autre procédé, inspiré de notre étude de l'action du froid sur les amibes de culture, nous a semblé également efficace : nous en reparlerons un peu plus loin.

Signalons que DESCHIENS [27], au lieu du repiquage, recommande la décantation quotidienne :

« Le milieu liquide usé est remplacé par de l'eau albuminée, fraîche, en ayant soin de conserver, au moment de la décantation, la lame de liquide située au fond du tube, dans l'angle dièdre formé par le plan du milieu solide et les parois du tube, cette zone étant particulièrement riche en amibes. »

Par ce procédé, sur un milieu classique, du type diphasique, DESCHIENS est arrivé à n'effectuer des repiquages que tous les dix jours.

Nous-mêmes n'avons pas utilisé régulièrement ce procédé, mais quelquefois, devant la nécessité d'accorder le rythme de nos cultures avec celui des infestations des animaux, nous avons heureusement pu recourir à son principe, pour faire durer quelques belles cultures dans leur condition optimale.

B. — TEMPÉRATURE DE CULTURE : ACTION DU FROID SUR LES AMIBES DE CULTURE

Si, dans le passé, certains auteurs ont utilisé pour leurs tentatives de culture des températures très diverses (comprises entre 15° et 37°C), à l'heure actuelle, il est universellement admis, et ceci depuis l'énoncé des principes de la technique de BOECK et DRBOHLAV, que la température optimale pour cultiver et entretenir l'amibe dysentérique est celle de 37°C. Et de ce fait, toutes les techniques actuelles recommandent la culture à cette température.

Toutefois, trop généralement, l'on est tenté de redouter pour l'amibe une extrême sensibilité aux variations de température.

Une température de 45°C est rapidement mortelle pour l'amibe ; mais un abaissement de quelques degrés au-dessous de 37°C ralentit seulement la mobilité des formes végétatives et, si le développement de la culture se trouve immédiatement stoppé, il n'en reste pas moins sûr que l'amibe dysentérique n'est pas tuée.

En 1930, les travaux de SIMITCH [82] ont mis en évidence la grande résistance des formes végétatives à l'abaissement de température. L'auteur a montré, en effet, à quel point cette capacité pouvait surprendre, augmentant même au fur et à mesure que les amibes de culture s'adaptent aux conditions de vie du milieu qui leur est imposé.

Ces faits furent vérifiés par TERRIAL en 1931, et par LANGERON en 1933.

Peu de temps après, DESCHIENS [29] devait également porter confirmation de cette opinion sur la résistance des amibes : ses expériences sont d'ailleurs démonstratives.

Opérant sur des amibes de culture dont les bactéries étaient détruites par addition de 1 p. 1.000 de trypaflavine, il détermine la durée de résistance des amibes dans d'assez larges limites de température. Ses résultats sont les suivants :

- | | | |
|------------|--------------------------------|--|
| — à 28°C : | durée de conservation : | 5 jours |
| — à 25°C : | » | 5 jours (avec environ 50 p. 100 de dégénérescence) |
| — à 18°C : | » | 8-9 jours |
| — à 5°C : | » | 11 jours |
| — à 0°C : | » | 36-48 jours |
| — à —5°C : | coagulation et mort des amibes | |

De telles expériences n'avaient pour objet que d'étudier la résistance des amibes au froid, et l'auteur n'en reconnaît pas moins que 37°C reste la température optimale pour leur culture.

Nous nous sommes livrés nous-mêmes à de simples vérifications de ces faits, et après avoir soumis à l'épreuve du froid les amibes de trois souches différentes et sur trois milieux différents, comme les auteurs précédents, nous ne pouvons que conclure à la grande résistance au froid des formes végétatives de culture.

TRAVAUX PERSONNELS

Nos expériences ont consisté à déterminer la durée de conservation des cultures de trois souches d'amibes dans trois milieux, et à trois températures distinctes : 37°C, 25°C, 5°C.

Elles diffèrent de celles de DOBELL par les points suivants :

1) *Les durées de conservation* que nous avons observées et exprimées dans les tableaux suivants, sont comptées à partir du quatrième jour de la culture normal à 37°C, soit à partir du moment de la culture maximum et jusqu'au jour de la mort de toutes les amibes, celle-ci étant révélée par l'observation microscopique et surtout confirmée par la négativité des subcultures pratiquées quotidiennement.

2) Nous n'avons pas cherché à détruire la flore bactérienne associée aux amibes.

RÉSULTATS :

Température : 37°C

- Milieu diphasique : durée moyenne : 2-3 jours (pourcentage de dégénérescence important)
- Milieu de BALAMUTH : durée moyenne : 2-3 jours (dégénérescence importante)
- Milieu de PAVLOVA : durée moyenne : 2-4 jours (dégénérescence importante)

Température : 25°C

- Milieu diphasique 3-4 jours
 - Milieu de BALAMUTH 2-4 jours
 - Milieu de PAVLOVA 3-4 jours
- (dans chaque milieu, pourcentage de dégénérescence important)

Température : 5°C

- Milieu diphasique 6-8 jours
- Milieu de BALAMUTH 6-7 jours
- Milieu de PAVLOVA 7-8 jours

Remarque :

1) Les chiffres précédents expriment les résultats moyens obtenus avec trois souches : IP, NS, W. Les variations de ces chiffres,

pour une souche à l'autre, s'étant révélées peu sensibles, nous n'avons pas estimé utile de les exprimer séparément.

Toutefois, la souche IP, la plus anciennement entretenue sur milieu N de l'IP (trois ans par nous et plus de cinq ans auparavant), donc certainement la mieux adaptée à la culture, nous a donné, en général, les plus longues durées de conservation (un à trois jours de plus).

2) Dans les cultures faites à $+5^{\circ}\text{C}$, les amibes prennent une forme arrondie, mais le léger réchauffement de la lame, dû au contact avec l'atmosphère du laboratoire, provoque une appréciable reprise de mobilité chez les formes encore vivantes : cette mobilité augmente au fur et à mesure que la température s'élève et se rapproche de 37°C .

Il ressort nettement de ces observations que la prolifération microbienne joue un rôle néfaste vis-à-vis de la culture de l'amibe. L'abaissement de température ralentit cette prolifération et, partant, prolonge la survie des amibes en diminuant les phénomènes de putréfaction.

Nous avons tiré de ces observations un moyen pratique pour garantir la pérennité de nos cultures.

En effet, au cours de l'entretien d'une culture, compte tenu du risque imprévisible d'un accident qui entraînerait la perte irrémédiable de la souche, la prudence commande toujours d'en effectuer le repiquage sur au moins deux milieux neufs.

Si une telle pratique est acceptable lorsqu'il ne s'agit que d'une souche, elle s'avère en revanche particulièrement ruineuse en milieux de culture quand il est question d'assurer en même temps l'entretien de plusieurs souches ; à plus forte raison l'a-t-elle été pour nous, qui entretenions chacune de nos souches sur trois milieux à la fois.

Une consommation excessive de milieux de culture a pu être évitée par le procédé suivant qui découle de nos précédentes observations, concernant la survie des amibes en culture, à la température de $+5^{\circ}\text{C}$: à savoir que quelle que soit la souche, quel que soit le milieu, les amibes après quatre jours de culture à 37°C survivent encore au moins cinq jours au frigidaire.

Ce procédé consiste tout simplement à repiquer la souche sur un seul tube « neuf » et à mettre au réfrigérateur le tube « usé ». Dans ces conditions, l'on s'assure d'une survie d'au moins cinq jours pour les amibes du tube « usé » et celles-ci servent ainsi de réserve, de sécurité, jusqu'au prochain repiquage et ainsi de suite.

Lorsque certaines fois, nous avons repiqué dans un milieu neuf des amibes qui furent cultivées deux à trois jours à 37°C et placées

ensuite vingt-quatre heures à la glacière, presque chaque fois nous avons été surpris par la rapidité de culture et l'abondance en amibes de la subculture : ceci nous obligea même parfois à avancer le repiquage suivant et à l'effectuer après deux ou trois jours seulement au lieu de quatre ou cinq. Dans ces conditions, les amibes se multipliaient donc plus rapidement, tandis que le développement bactérien semblait ralenti.

Nous avons cherché à utiliser cette observation pour diminuer la pollution bactérienne dans les milieux de culture lorsque celle-ci y était trop importante ; grâce au procédé suivant, nous avons obtenu d'assez bons résultats :

- repiquage dans un tube neuf (unique prélèvement d'amidon dans le fond du tube « usé ») : culture à 37°C pendant quarante-huit heures ;
- séjour de vingt-quatre heures à la glacière, puis de nouveau culture à 37°C pendant vingt-quatre heures ;
- repiquage sur milieu neuf.

Un nouveau traitement, selon le même rythme, était appliqué s'il en était besoin.

AUTRES UTILISATIONS DE LA RÉSISTANCE DES AMIBES AU FROID

1° Dans le but d'augmenter la longévité des cultures, DESCHIENS [29] a mis au point une technique basée sur la variation des températures.

La technique est la suivante :

L'auteur cultive une souche d'amibe dysentérique pendant quelques jours à la température habituelle de 37°C, puis au moment où le développement de la flore microbienne l'emporte sur celui de l'amibe, il soumet les tubes aux basses températures de 3°C et 5°C à la glacière et selon le rythme suivant : trois jours à 3°-5°C et un jour à 37°C, puis de nouveau trois jours à 3°-5°C et un jour à 37°C. Il put ainsi obtenir une durée de vie de dix-neuf jours.

Essayant de prolonger au maximum la période froide, DESCHIENS fit également l'expérience suivante : dix jours à 3°-5°C et deux jours à 37°C, puis dix jours à 3°-5°C et deux jours à 37°C. Cette fois, la longévité fut de onze jours.

2° Une autre méthode permettant d'entretenir facilement de nombreuses souches d'amibes au laboratoire, est celle préconisée par DOBELL [33].

L'auteur cultive les amibes pendant un certain temps sur des milieux dépourvus d'amidon, puis il provoque l'enkystement des

protozoaires par passage sur des milieux additionnés d'amidon ; il recueille les kystes et les met en réserve dans des tubes scellés, à la glacière vers $+ 10^{\circ}\text{C}$.

Dans ces conditions, selon DOBELL, les kystes sont capables de rester vivants pendant plus d'un mois, et de redonner naissance à des amibes que l'on peut conserver à volonté sous leurs formes végétatives, ou qui peuvent être de nouveau soumises à l'enkystement.

Plusieurs auteurs ont utilisé avec succès cette méthode de culture discontinue : en particulier COURDURIER [21] qui, recevant de DOBELL, une souche enkystée, a pu aisément la relancer sur milieux DOBELL-BRUMPT, et BÖCK-DRBOHLAV.

C. — LE pH DES CULTURES

Plusieurs auteurs, MUSGRAVE et CLEGG, en 1904, WALKER en 1909 etc... avaient déjà signalé qu'un certain degré d'alcalinité ou d'acidité paraissait nécessaire au bon développement des amibes en cultures et, de ce fait, presque toujours ces auteurs accompagnèrent leurs techniques d'indications concernant la réaction ionique du milieu.

Ainsi l'importance du pH des cultures a été comprise depuis longtemps.

Cependant, pour obtenir des notions précises sur la question, il a fallu attendre 1927, date où DESCHIENS [27] fit paraître les premiers résultats de ses expériences.

L'étude de DESCHIENS a porté sur des cultures en milieux renfermant de l'amidon ; et la première conclusion tirée par l'auteur fut, que pour obtenir un bon développement des cultures, il était nécessaire de partir d'un pH situé entre 7,2 et 7,6 ; en effet, il se produit en 30 à 36 heures, une rapide acidification du milieu amenant l'abaissement du pH en-dessous d'une valeur défavorable au développement des amibes (pH voisin de 6,2).

De plus, ainsi que PONS, vers la même époque, DESCHIENS observe aussi l'inconvénient d'un pH de départ trop alcalin qui rendrait les cultures irrégulières à pH 8 et négatives à pH 8,6.

En 1928, TANABE et CHIBA confirment les conclusions de DESCHIENS, et montrent que dans le milieu à l'asparagine, l'évolution du pH est la même que dans les milieux à l'amidon, mais seulement plus lente [88].

Finalement, c'est en 1929 que DESCHIENS [28] expose les résultats de ses dernières études et apporte alors de nouvelles précisions et l'explication définitive de l'évolution ionique dans le milieu de culture.

Milieu d'étude :

- phase solide : Dorset ou sérum coagulé ;
- phase liquide : Ringer albuminé ;
- *Amidon de riz* : stérilisé (par chauffage au four pendant 1 heure à 120°C) selon la prescription de DOBELL, afin d'éviter l'introduction accidentelle d'une flore trop acidifiante, susceptible d'enrayer le développement de la culture.

Dans ces conditions, DESCHIEENS constate que le pH conditionnel du départ des cultures est moins rigoureux qu'il ne l'avait d'abord pensé ; car, à partir de pH variant régulièrement de 6,0 à 8,8, il obtient facilement des cultures. Déjà, après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, dans tous ses tubes le pH est amené et stabilisé entre 6,6 et 6,8 et la culture positive.

« La flore associée et les amibes avaient ainsi fixé le milieu à un pH déterminé et constant, favorable au développement des amibes, en alcalisant ou acidifiant le milieu selon sa réaction initiale. »

Toutefois, l'auteur précise qu'il est préférable de partir d'un milieu dont le pH est situé entre 7,2 et 7,8 si l'on veut avoir facilement et rapidement une culture abondante.

Dans l'ensemble le milieu passe donc, selon DESCHIEENS, par deux phases :

1° Une phase de fermentation butyrique de l'amidon, due à « *bacillus acidici butyrici* » anaérobie présent dans la flore associée ; cette fermentation se développe du 1^{er} au 4^e ou 5^e jour, et aboutit au pH 6,6 favorable au développement des amibes.

2° Une phase de putréfaction avec dislocation des albumines et production d'acides aminés puis d'ammoniaque, ce qui entraîne la dégénérescence et la mort des amibes.

Ainsi que l'avait constaté DOBELL, DESCHIEENS confirme que l'empois d'amidon et l'amidon soluble ne peuvent remplacer l'amidon figuré : en effet, avec ces substances, il y a une trop rapide acidification du milieu, qui est défavorable à la croissance des amibes.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

Nos observations nous ont permis de retrouver à peu près l'évolution de pH décrite par DESCHIEENS, du moins en ce qui concerne la première phase d'acidification du milieu, due à la fermentation de l'amidon ; car du fait de l'absence d'albumine dans nos milieux, à la différence de ceux étudiés par DESCHIEENS, nous n'avons pas observé

le relèvement du pH vers le 6^e jour ; relèvement qui n'est en somme que la simple traduction de la phase de putréfaction des albumines.

Nous résumons dans le tableau suivant les observations concernant l'évolution du pH des cultures dans les milieux que nous avons utilisés.

EVOLUTION DU pH AU COURS DE LA CULTURE

Jours	1	2	3	4	5	6	7
a) <i>Milieu diphasique :</i> <i>Milieu N de l'I.P. :</i>							
— pH	7,2	6,5	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
— Richesse en amibes		++	+++	+++	++	+	+
b) <i>Milieu de Balamuth :</i>							
— pH	7,2	6,5	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
— Richesse en amibes		+	+++	+++	++	+	+
c) <i>Milieu de Pavlova :</i>							
— pH	7,1	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
— Richesse en amibes		+	++	+++	+++	++	+

CONCLUSIONS ET COMMENTAIRES

Les pH de départ des cultures dans nos milieux sont :

- 7,2 $\pm$ 0,1 pour le milieu N de l'I.P.
- 7,2 pour le milieu N de BALAMUTH,
- 7,1 $\pm$ pour le milieu N de PAVLOVA

et, au bout de 4 jours de culture, ces pH correspondent respectivement aux valeurs :

6,4 6,3 et 6,4

pour le maximum de croissance d'amibes.

Le fait remarquable de ces observations est la chute brutale du pH, en moins de vingt-quatre heures après l'ensemencement. Le pH se trouve amené d'emblée aux environs de 6,4 où il se stabilise pendant tout le temps efficace de la culture.

D. — LA FLORE MICROBIENNE DES MILIEUX DE CULTURE

Jusqu'à ce jour il n'a pas été possible d'obtenir la culture pure d'« *Entamoeba dysenteriae* » et sur les milieux habituellement employés, en particulier sur ceux que nous avons étudiés, les amibes croissent toujours au milieu d'une flore microbienne importante.

D'ailleurs, nous savons que l'amibe de culture utilise les bactéries vivantes pour son métabolisme, et que celles-ci assurent dans le milieu, les conditions d'anaérobiose nécessaires à la culture.

Pour ces raisons, les bactéries sont donc indispensables à l'amibe.

Cependant, il n'en est pas moins vrai que cette flore microbienne peut être aussi une cause d'échec de la culture ; soit par son *développement* exagéré, soit par sa *nature*, elle est susceptible, en effet d'exercer une action défavorable.

SON DEVELOPPEMENT

Sans que nous ayions toujours pu l'expliquer par des fautes de manipulations, qui auraient entraîné des contaminations accidentelles de nos cultures, nous avons constaté, quelquefois, l'apparition dans celles-ci d'un développement abondant des bactéries, suivi d'une dégénérescence des amibes.

Dans ces circonstances, les amibes se montraient aussitôt moins nombreuses, mais surtout plus petites, d'aspect rétracté et souvent arrondies ; leurs mouvements étaient considérablement ralentis ou simplement réduits à la formation de petits pseudopodes.

Comme nous l'avons signalé plus haut, c'est essentiellement en augmentant le rythme des repiquages, effectués avec des prélèvements-ensemencements minutieux, et en faisant appel à l'action du froid, que nous avons pu ordinairement lutter contre ces pollutions néfastes.

Dans certains cas nous avons été obligés d'avoir recours à l'emploi des antibiotiques ; l'introduction de pénicilline dans les milieux de culture, à raison de 3.000 UI par tube de milieu diphasique (soit pour environ 5 ml de milieu) et 2.000 UI par tube (4,5 ml de milieu) pour les deux autres milieux, à une ou deux reprises, nous a généralement permis de réduire la pollution et de rétablir l'équilibre de la culture sans en compromettre le développement ultérieur.

Nous avons noté cependant qu'il n'était pas prudent de prolonger le traitement antibiotique au delà de trois ou quatre repiquages, car dans ce cas, sévèrement privées de leurs bactéries, les cultures risquent de périr.

SA NATURE

DOBELL n'a que partiellement réussi à déterminer la nature de la flore associée favorable aux cultures d'« *Entamoeba dysenteriae* ».

Il isole trois bacilles : l'un se rapprochant de « *Bacillus dysenteriae Shiga* », un autre étant « *Bacillus lactis aerogenes* », et le troisième

voisin du deuxième ; mais ses tentatives de modifications de la flore, dans le but de trouver des bactéries favorables, ne lui donnent pas entière satisfaction.

C'est qu'en réalité les germes de la flore associée sont très nombreux. Ils proviennent de la flore intestinale de l'homme, et sont en quelque sorte le résultat stable et équilibré d'une sélection naturelle, spontanément effectuée dans le but de la meilleure adaptation au métabolisme des amibes, et aux conditions de vie dans leurs milieux de culture.

Cette flore est donc stable et normalement favorable à la culture de l'amibe. Par contre, quand elle connaît des dérèglements ou un apport étranger de microbes, elle peut être néfaste à la culture.

Dans les milieux qui, à l'exemple de ceux que nous avons étudiés, renferment de l'amidon, comme dans ceux qui contiennent de l'albumine, il convient d'ajouter à la flore précédente, les bactéries responsables de la fermentation de ces produits : à savoir, les bactéries de la fermentation butyrique de l'amidon, et celles de la putréfaction des albumines.

Avec ces dernières bactéries, nous reconnaissons d'ailleurs un des avantages de l'observation du pH, qui est de nous permettre de suivre, indirectement, mais assez fidèlement, le rôle joué par la flore bactérienne dans les milieux de culture.

E. — ROLE DES ALIMENTS FIGURES ET AUTRES FACTEURS FAVORISANTS DANS LES MILIEUX DE CULTURE

Amidon de riz — Muscle de bœuf, poudre de poisson
Hémoglobine — Cellules muqueuses et mucine

• *Amidon de riz*

En mars 1926, BRUMPT signale l'action favorisante de l'amidon de riz ajouté aux milieux de culture ; selon cet auteur, cette substance servirait de nourriture aux amibes et favoriserait leur développement.

Cette observation est confirmée par DOBELL et LAIDLAW et c'est dans le but de fournir aux cultures d'« *Entamoeba dysenteriae* » une quantité suffisante d'hydrates de carbone, sans craindre leur rapide décomposition par les bactéries et l'acidification du milieu, que ces auteurs utilisent l'amidon de riz.

Au terme de leur étude, DOBELL et LAIDLAW [36] arrivent aux conclusions suivantes :

- la croissance des amibes est favorisée par l'amidon de riz ; les amibes se multiplient rapidement, ingèrent des grains d'amidon qu'elles utilisent pour constituer des réserves glucidiques ;
- tous les amidons ne conviennent pas ; ceux du blé, sagou, pois, tapioca, maïs, pomme de terre, arrow-root, certainement en raison de leur trop grosse taille, ne peuvent pas être ingérés par les amibes (SAUTET 1926) ;
- il est nécessaire de stériliser l'amidon pour assurer la destruction de tous les germes, et éviter l'introduction dans les milieux, d'une flore trop rapidement acidifiante. Les auteurs recommandent la stérilisation par petites quantités, par chauffage au four pendant une heure à 120°C.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

A la dose moyenne de 0,03 g par tube, l'amidon de riz s'est révélé nécessaire dans nos milieux.

Dans ceux-ci, lorsque nous n'en mettons qu'une faible quantité (inférieure à 0,01 g), ou pas du tout, les amibes végétaient et ne se multipliaient pas.

A la suite de cette observation, nous avons pensé un moment que le développement des amibes pouvait être favorisé par une augmentation de la quantité d'amidon ; mais nos essais nous en ont dissuadé : une dose excessive (supérieure à 0,05 g) s'étant révélée plutôt défavorable à la croissance des amibes.

L'amidon que nous utilisions était stérilisé, à raison de 2 g dans des tubes bouchés au coton, par chauffage à 160°C pendant une heure et trois jours consécutifs.

• *Poudre de bœuf et de poisson*

En 1950, CHIPCHIDZE et DESCHIENS utilisent ces substances comme éléments figurés dans un milieu de culture pour l'amibe.

Ce milieu, nous l'avons déjà présenté, il offre l'avantage d'une longévité accrue des cultures, grâce à un ralentissement des phénomènes de fermentation.

• *Hématies et hémoglobine*

Etant donné le caractère hématophage d'*Entamoeba dysenteriae*, DRBOHLAV, dès ses premiers essais, étudie l'action du sang normal

ou inactivé, et de l'hémoglobine en poudre ou en solution, ajoutée au milieu de culture.

Mais les résultats qu'il obtient ne sont pas convaincants, et DRBOHLAV conclut que ces substances ne sont pas nécessaires à la culture de l'amibe.

En 1926, KOFOID et WAGNER obtiennent les mêmes résultats négatifs en utilisant du sang d'origine humaine ou animale en suspension dans du liquide de Locke ; leur tentative laisse penser aussi à une action défavorable de l'hémoglobine et des hématies.

Après 1933, DESCHIENS et ses collaborateurs, DASPECT et JONCHÈRES [24] reprennent des expériences similaires. Ils estiment, en effet, que les insuccès des tentatives précédentes sont dus surtout à l'utilisation de quantités trop importantes de sang ou d'hémoglobine, lesquelles, en amenant dans les milieux un enrichissement en albumine, occasionnent nécessairement une rapide putréfaction et la destruction des amibes. Aussi utilisent-ils, non des suspensions d'hématies ou de l'hémoglobine en poudre, mais des solutions diluées d'hémoglobine. Les auteurs précités arrivent ainsi aux conclusions que les cultures d'amibes sont favorablement influencées par des doses allant de 5 à 15 gouttes d'une solution à 1 p. 100 d'hémoglobine de bœuf dans du liquide de Ringer.

Dans ces mêmes conditions, avec le milieu de CHIPCHIDZE-DESCHIENS, DASPECT et JONCHÈRES observent une action favorisante sur la croissance et le développement des amibes, sans aucune réduction de la longévité moyenne de leur culture.

Par ailleurs, BRUMPT affirme que les amibes de culture deviennent hémaphages si on introduit quelques gouttes de sang dans les milieux où elles vivent. Ayant supposé qu'une telle expérience pouvait être à la base d'un moyen de restituer la virulence (vis-à-vis du Rat) à nos souches, nous avons été amené à éprouver ce fait à plusieurs reprises. Cependant nos tentatives d'infestation du Rat, pratiquées par injection intra-cæcale d'amibes dont les cultures avaient reçu, pendant deux-trois repiquages, des gouttes de sang de Rat et de Hamster, sont demeurées négatives.

En outre, l'addition de sang n'a jamais eu d'action favorisante sur nos cultures d'amibes.

• *Cellules muqueuses et mucine*

Nous signalerons ici les travaux de MORITA [60] ; l'auteur, étudiant l'action cytolytique d'*Entamoeba dysenteriae*, s'est livré à des expériences, dans lesquelles il mit en contact des amibes de culture

avec des suspensions de cellules muqueuses provenant de divers animaux. Ayant observé une nette diminution du nombre de ces cellules dans les suspensions où il trouvait par contre des amibes en abondance, MORITA conclut à une action cytolytique d'*Entamoeba dysenteriae* et réciproquement à une action favorisante des cellules muqueuses sur la culture de l'amibe.

On sait que la *poudre de mucine gastrique* est parfois utilisée comme agent favorisant le pouvoir agressif microbien ; certains auteurs l'ont aussi déjà ajoutée dans des milieux de culture de bactéries pour augmenter la croissance de ces dernières.

S'inspirant de tels essais et de la constatation que, chez l'Homme, les premières infestations s'effectuent toujours au niveau de la muqueuse intestinale riche en mucine, DOLKART et HALPERN [37] éprouvèrent également cette substance dans les cultures d'*Entamoeba dysenteriae*. Les auteurs sont ainsi parvenus à mettre au point un milieu de culture et, grâce à celui-ci, ont noté une action très favorable de la mucine gastrique.

CONCLUSIONS

Ainsi les substances auxquelles on a pensé pour favoriser la croissance des amibes dans les cultures sont très nombreuses et diverses.

Au cours de nos recherches, nous avons été amenés à en essayer quelques autres : la vitamine D, la progestérone, le cholestérol par exemple. Les résultats furent en général peu concluants ; mais ces tentatives ayant été effectuées dans le cadre de nos expériences sur la virulence de l'amibe en culture, nous n'en exprimerons les résultats qu'au chapitre correspondant.

V. — MORPHOLOGIE ET CYCLE DE DEVELOPPEMENT "D'ENTAMŒBA DYSENTERIÆ" EN CULTURE

Jusqu'en 1924, faute d'un matériel amibien vivant, stable en culture et présenté dans des conditions favorables à l'observation, ni le rôle pathogène, ni le cycle de développement de l'amibe et sa morphologie exacte n'avaient pu être valablement étudiés.

Certes, plusieurs auteurs, NOC (1913), PENFOLD, WOODCOCK et DREW (1916), YOSHIDA (1918-1920)..., avaient tenté d'observer la multiplication des amibes et avaient même fourni quelques indications. Cependant, ce n'est qu'après la découverte de BOECK et DRBOHLAV que la connaissance du cycle de développement de l'amibe put gagner quelques précisions.

A l'heure actuelle, grâce à de nombreux travaux, à ceux de DOBELL notamment, l'on possède des connaissances assez précises sur le cycle évolutif et la morphologie d'*Entamoeba dysenteriae* en culture.

Nous les résumons ici brièvement.

Ce cycle comprend, dans ses grandes lignes, plusieurs stades successifs mais observables, cependant, simultanément dans une même culture.

Des amibes se développent, se multiplient par division binaire, puis certaines s'enkystent; les kystes donnent naissance à de nouvelles amibes qui grandissent, se différencient, se multiplient et s'enkystent à leur tour. Les nouveaux kystes redonnent naissance à de nouvelles amibes et ainsi de suite.

Tous ces divers stades correspondent à différents aspects morphologiques, et on en a fait les distinctions suivantes :

- a) Les amibes végétatives : les amibes trophiques.
- b) Les amibes prékystiques.
- c) Les kystes : le phénomène de l'enkystement, le dékystement.
- d) Les amibes métakystiques (amibes jeunes issues du kyste).

• *L'amibe trophique de culture*

Cette forme végétative des milieux de culture présente une morphologie très voisine de celle de l'amibe des milieux pathogènes.

Quelques caractères particuliers l'en différencient cependant, à savoir : une taille plus petite, un protoplasme moins clair et, bien sûr, l'absence de globules rouges.

En milieu renfermant de l'amidon, les amibes peuvent en ingérer de nombreux grains, et atteindre ainsi des tailles relativement élevées (10 à 45 μ).

Le noyau est identique en tout point à celui des formes biologiques ; il présente un caryosome central et une fine couche de chromatine à sa périphérie.

— *Remarque* : en culture, c'est essentiellement le processus de division binaire qui est responsable de la prolifération des amibes. Bien plus souvent que des formes kystiques, en effet, l'on peut observer dans les cultures des amibes en cours de division.

Cependant, l'enkystement spontané en culture est actuellement un phénomène bien démontré, et il semble ainsi hors de doute que la multiplication des amibes résulte aussi, du moins à certains moments, du cycle complet que nous décrivons.

• *L'amibe pré-kystique*

Cette amibe vient de la transformation de la forme précédente.

Sa taille est plus petite et déjà voisine de celle du kyste auquel elle donnera naissance ; elle ne renferme ni amidon, ni bactéries dans son protoplasme, mais du glycogène à réaction iodophile et quelques bâtonnets sidérophiles.

Le noyau de cette forme prékystique est caractéristique ; la couche de chromatine périphérique est épaisse et le centriole légèrement excentrique et plus volumineux : cette forme particulière du noyau serait, selon DOBELL, la conséquence d'une récente division.

• *Le kyste*

1) LE PHÉNOMÈNE DE L'ENKYSTEMENT

Ainsi que le phénomène a été observé chez l'homme, l'enkystement, dans les milieux de cultures, n'est ni constant ni même régu-

lier ; ceci le rend donc peu évident. De plus, il semble que le phénomène s'effectue de manière identique dans les deux cas.

Confirmant cette hypothèse, en effet, les travaux de L. LAMY [55] permettent d'affirmer que, lorsqu'elles sont entretenues dans des milieux de cultures constants et convenables, les amibes y retrouvent les conditions d'un « intestin normal » et s'enkystent alors spontanément.

Evolution :

L'amibe prékystique se transforme assez rapidement en un kyste uninucléé (en deux heures, selon DOBELL); puis ce kyste, par suite de deux divisions nucléaires successives, donne un kyste à quatre noyaux.

Le passage du stade uninucléé au stade quadrinucléé peut s'effectuer en six heures environ ; les kystes mûrs sont riches en glycogène et présentent une taille variant de 10 à 16 μ .

Dans une même culture, on peut d'ailleurs observer plusieurs stades d'évolution du kyste, selon son degré de maturité. Mais le nombre de kystes observés à un moment donné ne peut absolument pas être considéré comme significatif d'un taux d'enkystement ; car, comme l'ont noté CLEVELAND et SANDERS (1930), les phénomènes d'enkystement et de dékystement peuvent s'effectuer simultanément dans la même culture.

La *longévité* du kyste est fonction de la température, du pH et des bactéries associées ; une température basse ralentit leur métabolisme et augmente leur survie.

En milieu défavorable, les kystes dégènèrent et sont rapidement détériorés s'ils ne sont pas réensemencés en milieu neuf.

Dans la solution de Ringer ou dans l'eau physiologique, il semble que les kystes peuvent résister plusieurs semaines soit à la glacière, soit même à la température ordinaire. A 37°C, leur survie est très courte ; toute dessiccation les tue rapidement, de même que les formes végétatives.

— *Remarque :* le développement du kyste s'arrête généralement au stade quadrinucléé ; mais il n'est pas rare qu'il se poursuive à un stade plus avancé, quoique anormal, conduisant alors à des kystes à huit noyaux.

Ce stade correspondrait au stade seize noyaux, observé quelquefois avec *Entamoeba coli*.

De tels kystes ont généralement une taille supérieure à la normale (18-20 μ).

2) LE DÉKYSTEMENT

Selon DOBELL, le phénomène se passerait de la manière suivante : pendant le dékystement, le protoplasme et les quatre noyaux s'échappent au travers une fine perforation de la paroi du kyste.

L'évolution dans les premières heures est la suivante : il y a d'abord disparition du glycogène et des inclusions sidérophiles ; puis le protoplasme du kyste semble se dissocier de son enveloppe externe, et il s'anime de quelques légers mouvements avec formation de pseudopodes, comme si une véritable amibe, nouvellement formée, tentait de s'échapper au dehors de l'enveloppe kystique.

S'appliquant en un unique point de la paroi, un pseudopode finit par la perforer, et on le voit apparaître alors à l'extérieur sous forme d'une petite hernie (grâce peut-être à un ferment spécial, l'amibe réalise cette perforation de la paroi du kyste).

Progressivement, par mouvements successifs, le protoplasme émerge hors de l'enveloppe kystique jusqu'à ce que, finalement, l'organisme entier se soit extériorisé. Un dernier pseudopode reste généralement accroché à l'orifice de sortie et, dans les premiers instants, on peut observer l'amibe qui, en se mouvant, entraîne avec elle son enveloppe vide.

Par des mouvements accélérés, l'amibe parvient à se débarrasser complètement de son enveloppe ; elle se met alors à ingérer bactéries et grains d'amidon. Le phénomène dure un temps plus ou moins long ; il peut s'effectuer en un quart d'heure, plus généralement en une demi-heure ; d'autres fois, une heure est nécessaire.

• *L'amibe méta-kystique*

Jusqu'en 1928, on a cru que le kyste donnait naissance à quatre amibes uninucléées ou à une seule amibe uninucléée qui se divisait plus tard en quatre amibes uninucléées.

Il est maintenant établi que ces deux hypothèses sont fausses :

- la première est infirmée, ainsi que nous l'avons vu, par l'issue hors du kyste d'une unique amibe quadrinucléée ;
- et le développement de l'amibe métakystique vient maintenant détruire la seconde hypothèse.

D'après DOBELL, ce développement s'effectue selon les modalités suivantes :

- la nouvelle amibe quadrinucléée donne naissance non à quatre amibes, mais à huit petites amibes uninucléées ;
- chaque division du cytoplasme est précédée d'une division nucléaire ;

- chacun des noyaux initiaux ne se divise qu'une fois au cours du développement métakystique ;
- entre deux divisions successives du cytoplasme, il y a une période intercalaire de développement de l'amibe.

La division complète de l'amibe métakystique demande environ onze à treize heures d'incubation.

Les huit nouvelles amœbules se développent ensuite et deviennent de véritables amibes trophiques en quelques heures ; le cycle est ainsi terminé.

VI. — CONCLUSION

Au terme de ce premier chapitre consacré à la culture de l'amibe dysentérique, nous bornerons notre conclusion à la présentation des qualités pratiques des trois milieux que nous avons particulièrement étudiés.

Deux objectifs nous ont guidé dans le choix de ces milieux :

1° L'entretien facile et commode des souches de l'amibe dysentérique au laboratoire.

2° La mise au point d'une épreuve efficace pour la recherche de l'activité amœbicide *in vitro*.

Avec ces trois milieux, nous pensons avoir obtenu entière satisfaction.

Ils sont, en effet, d'une préparation rapide, aisée et permettent d'obtenir en un temps satisfaisant de très belles cultures, riches et stables.

— *Le milieu diphasique* (milieu N de l'IP) est, à notre avis, le plus favorable à la culture et le plus convenable pour l'entretien régulier de l'amibe au laboratoire. C'est à lui qu'il convient de s'adresser le plus généralement pour le diagnostic de l'amibiase, la mise en culture des souches, ou leur transport.

— *Les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA* exigent, en général, plus de soin pour une bonne et définitive acclimatation d'une souche d'amibe dysentérique. Mais, en plus de l'intérêt d'une préparation extrêmement simple et rapide, ces milieux offrent l'appréciable avantage de répondre parfaitement, ainsi que nous le verrons dans le prochain chapitre, à toutes les exigences des essais pharmacologiques *in vitro*.

LES TECHNIQUES D'ESSAI "IN VITRO"

PLAN DU CHAPITRE

I — LES PRINCIPAUX AMCEBICIDES

II — RAPPEL DE QUELQUES TECHNIQUES ANTERIEURES

III — CONDITIONS DE L'ESSAI "IN VITRO "

IV - DESCRIPTION DE DEUX TECHNIQUES D'ESSAI "IN VITRO "

V — APPLICATION A L'ETUDE DE QUELQUES PRODUITS

AVANT-PROPOS

En face d'une affection quelconque et, notamment, de celle insidieuse qu'est l'amibiase, une urgente nécessité s'impose, commandée par le souci de guérir, c'est sa thérapeutique.

Aussi, pour cette raison, les chercheurs, dès qu'ils crurent posséder les premières indications sur la maladie amibienne, se sont attachés à lui trouver des remèdes, c'est-à-dire des substances susceptibles d'agir sur son agent causal : l'amibe dysentérique.

Or à la lumière de notre exposé historique sur les cultures, nous avons vu dans quelle atmosphère d'incertitude ont été entreprises les recherches sur le rôle pathogène, la morphologie et la biologie de *Entamoeba dysenteriae* ; tous les résultats erronés des premières tentatives n'ayant servi, en effet et jusqu'à une date très avancée, qu'à entretenir des erreurs sur la véritable connaissance de ces questions.

Dans ces conditions, nous le concevons aisément, l'étude de l'action amœbicide des différents corps n'a pu être entreprise valablement qu'à partir du moment où l'on a disposé de cette amibe, vivante, dans les conditions d'une étude convenable et sûre ; c'est-à-dire, à partir seulement de la découverte de BOECK et DRBOHLAV.

Alors, très rapidement les travaux se sont multipliés ; et ainsi, au fur et à mesure de leurs découvertes, ce sont de très nombreuses substances qui furent mises en œuvre pour lutter contre *E. dysenteriae*.

Ces substances appartiennent à des groupes assez divers ; aussi il nous a semblé utile, en ce chapitre consacré aux procédés de sélection des corps amœbicides, d'en noter brièvement les plus intéressantes.

De plus, pour la simple raison que les deux techniques d'essai que nous exposerons sont inspirées de certaines autres utilisées antérieurement par plusieurs auteurs, nous avons estimé également nécessaire d'en rappeler les principales. D'ailleurs, cette étude ne sera pas

sans utilité, car elle nous permettra de justifier, à la lumière des imperfections observées, la mise au point et le bien-fondé des détails de technique que nous présentons en définitive.

Ainsi s'acheminera notre exposé dans ce chapitre. Nous le terminerons en donnant les résultats obtenus avec certains corps que nous avons essayés, en appliquant les deux techniques présentées.

I. — LES PRINCIPAUX AMŒBICIDES

La thérapeutique antiamibienne dispose à l'heure actuelle d'un très grand nombre de produits. En effet, aux médicaments classiques bien connus, sont venus s'ajouter, au cours de ces dernières années, des produits nouveaux, comme les antibiotiques, et aussi de nombreux dérivés synthétiques.

Nous nous bornerons ici à faire une brève présentation de ces principales substances, adoptant, ainsi que le proposent BLANC et ses collaborateurs [7], une classification en trois groupes.

1° Les amœbicides diffusibles par la voie sanguine agissant électriquement sur les amibes histolytiques et hématophages, qu'ils peuvent atteindre jusqu'au niveau des lésions intestinales et hépatiques. Ce sont les médicaments de « l'amibiase-maladie ».

2° Les amœbicides de contact, très nombreux, actifs dans l'intestin exclusivement et par contact direct avec les trophozoïtes ou les kystes d'*E. dysenteriae*. Ce sont les médicaments de « l'amibiase-infestation » administrés généralement en association avec les précédents ou dans les cures de consolidation.

3° Les antibiotiques, d'origine fongique ou microbienne, rarement amœbicides, et surtout efficaces sur la flore bactérienne associée au protozoaire dont on connaît le rôle important dans la physiopathologie de l'amibiase.

PREMIER GROUPE AMŒBICIDES DIFFUSIBLES

- *Éméline*

La réputation de l'émétine n'est plus à établir : ce produit a été pendant longtemps le seul remède de l'amibiase intestinale, et même à l'heure actuelle il reste, à l'avis de bon nombre de praticiens, un des plus efficaces.

L'émétine est le principal alcaloïde de diverses espèces d'ipéca ; on l'obtient soit par une extraction directe de la racine d'ipéca, soit par synthèse.

Généralement employée à l'état de chlorhydrate, l'émétine présente sous cette forme la formule brute $C_{29}H_{40}O_3N_2 \cdot 2 ClH$, qui fut établie, en 1924, par CARR et PYMAN.

Vis-à-vis de l'amibe dysentérique, ce médicament manifeste une remarquable activité aussi bien *in vitro* que *in vivo*. *In vitro*, il agirait encore, selon DOBELL, à une concentration aussi faible que 1 pour 5 millions. Dans nos propres expériences, ce chiffre s'est révélé légèrement inférieur : 1 pour 2 millions.

Dans l'amibiase humaine, il est incontestable que l'émétine donne aussi de réels résultats. Cependant, l'émétine n'a pas d'action sur les kystes ; de plus, sa toxicité, son accumulation dans l'organisme et l'émétino-résistance rendent délicate sa médication et la limitent à des cures discontinues. Aussi on lui associe, généralement, d'autres substances, soit pour réduire sa toxicité, soit pour compléter son action.

L'émétine est administrée, habituellement, par la voie sous-cutanée. Certains auteurs, cependant, dans le but de réaliser une concentration locale plus efficace, ont également préconisé l'ingestion *per os* et sous forme de comprimés enrobés.

Le chlorhydrate est la forme la plus courante, mais d'autres sels d'émétine (iodure d'émétine et de bismuth) sont aussi utilisés.

• *Holarrhenas et conessine*

La conessine est un alcaloïde qui fut découvert et extrait pour la première fois aux Indes, à partir de l'écorce d'une apocyanocée, le « Kurchi » (*Holarrhena antidysenteriae*). Cet alcaloïde existe aussi dans une espèce africaine, le « Séoulou » (*H. africana* ou *H. floribunda*) et son usage comme antidysentérique fut préconisé par le Professeur PARIS.

Dans sa drogue d'origine, la conessine coexiste avec une série de substances voisines. Sa formule brute : $C_{24}H_{10}N_2$, est connue depuis longtemps et sa structure se rapproche un peu de celle de l'émétine.

In vitro, la conessine possède un pouvoir amœbicide direct (PIETTE, GUIGNARD, BONNIN) ; son activité est légèrement inférieure à celle de l'émétine.

En clinique, la conessine fournit aussi de bons résultats ; et, encore actuellement, des auteurs considèrent ce médicament comme le meilleur adjuvant de la médication émétinienne.

Signalons cependant que la conessine peut provoquer des incidents d'intolérance, le plus souvent d'ordre sensoriel et neurologique (insomnies, tremblements, angoisse, délire), en particulier chez les sujets prédisposés. Les contre-indications de la conessinothérapie sont ainsi : l'hypersympathicotomie, l'imprégnation éthylique, les tares psychiques ou mentales et, en fait, ces contre-indications tendent à orienter les recherches vers d'autres substances mieux tolérées.

• 2-déhydroémétine (2-D.H.E.)

La 2-déhydroémétine est un produit récent qui fut synthétisé par BROSSI et ses collaborateurs [11] au cours d'importantes recherches sur la structure des alcaloïdes de l'ipéca.

Selon les travaux de BLANC et de ses collaborateurs, la 2 D.H.E. inhibe la croissance d'*E. dysenteriae* à la concentration de 100 µg/ml. Dans l'amibiase expérimentale du Rat, elle est environ six fois plus active que l'émétine.

Les expériences de GONZALES DE COSSIO [41] et de SCHWARTZ et RIEDER [81] prouvent que la 2 D.H.E. est moins toxique que l'émétine et aussi mieux tolérée ; elle s'élimine, en effet, deux fois plus vite que l'alcaloïde naturel.

Nous avons étudié comparativement la toxicité aiguë chez la Souris par différentes voies d'administration, puis le pouvoir amœbicide *in vitro* de la 2-déhydroémétine et de l'émétine [18].

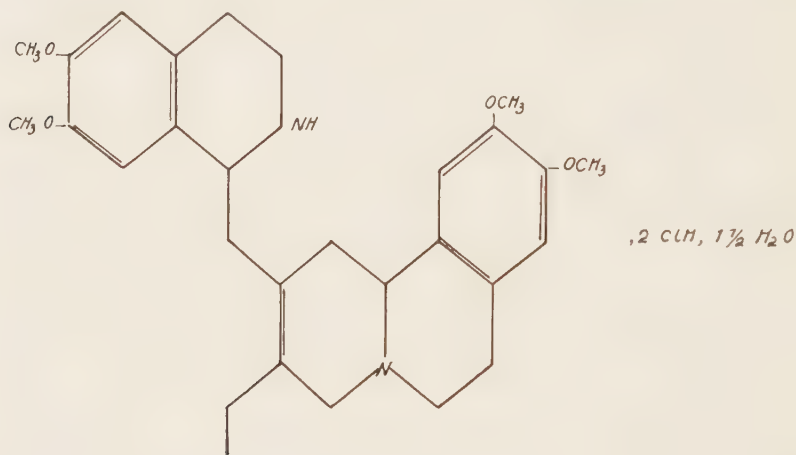
En ce qui concerne la toxicité, nous avons trouvé les valeurs suivantes pour les DL 50, suivant la technique classique de KAERBER et BEHRENS.

	DL 50 en mg/kg	
	Emétine	2 D.H.E.
Voie orale		52,5
Voie sous-cutanée	41,5	52,5 à 61
Voie intra-veineuse		27

L'étude de l'action amœbicide *in vitro* nous a révélé une très forte efficacité de la 2 D.H.E. comparable à celle de l'émétine et supérieure même dans certaines conditions (action plus rapide). Nous faisons, plus loin, le compte rendu détaillé de nos expériences.

Les essais cliniques effectués dans l'amibiase colique (BLANC) et dans l'amibiase hépatique (MONTELLANO) ont déjà donné d'excellents résultats. Le médicament est administré par la voie intramusculaire.

Ainsi la 2 D.H.E. apparaît comme un médicament de grande valeur, dont le mode d'action est très voisin de celui de l'émétine ; s'éliminant plus vite et moins toxique, il permet une meilleure posologie et la prolongation des cures.



DEUXIEME GROUPE AMÆBICIDES DE CONTACT

• Médicaments d'origine végétale

Dans ce groupe, nous ne citerons que les produits extraits des simaroubacées.

« Ko Sam » ou « Ya-Tan-Tzu » : sous ces noms, les Chinois emploient depuis fort longtemps, comme antidysentériques, les semences d'une simaroubacée : *Brucea javanica*. Le principe actif de la drogue n'est pas connu avec certitude ; quoi qu'il en soit, son efficacité est certaine.

Diverses espèces du genre *Simarouba* (*Simarouba glauca*, *Simarouba amara*) sont également utilisées par les indigènes d'Amérique du Sud. Ici, les principes actifs ont été identifiés : ce sont des glucosides : la *simaroubine* ou *glaucarubine* d'une part, et la *Simaroubéine* d'autre part. Seule la *glaucarubine* a déjà été confrontée avec l'amide dysentérique, *in vitro* et *in vivo* : les résultats obtenus montrent une appréciable efficacité.

En ce qui concerne les essais cliniques pratiqués depuis quelques années, ils confirment aussi l'intérêt que méritent ces nouveaux médicaments. Administrés par voie buccale, sous forme pure (glaucarubine) ou sous forme d'extrait total (*Simarouba amara*), ces substances permettent d'obtenir un fort pourcentage de guérisons et, en particulier, dans les cas d'échecs avec les traitements classiques.

• *Produits de synthèse*

1) DÉRIVÉS DE LA QUINOLÉINE

Dans ce groupe, on distingue d'abord les dérivés iodés de l'oxyquinoléine. Ces médicaments peu toxiques et bien tolérés sont surtout utilisés dans les formes chroniques de l'amibiase intestinale, ou à la fin des épisodes aigus.

Les principaux représentants de ce groupe sont :

- *Yatrène* : chiniofon ou mixiod (7-iodo 8-hydroxy quinoléine 5-sulfonate de sodium).
- *Vioforme* : chloroiodoquine (7-iodo 5-chloro 8-hydroxy quinoléine).
- *Diodoxyquinoléine* : direxiodé ou diiodoquine (5,7-diiodo 8-hydroxyquinoléine).

Tous ces médicaments donnent de bons résultats et, parmi eux, le direxiodé semble pouvoir être utilisé en chimioprophylaxie anti-amibienne (CRAIG).

- *Paramibe* (5,7-dibromo 8-oxyquinoléine) :

Dérivé bromé de l'oxyquinoléine, ce médicament est à rapprocher des produits précédents. Il est bien toléré et semble exercer son action essentiellement dans l'amibiase intestinale aiguë.

Laissant de côté de nombreux autres dérivés, dont l'efficacité n'est pas encore nettement confirmée, signalons encore trois autres composés de la quinoléine.

- *Chloroquine et camoquine* (amodiaquine, flavoquine) :

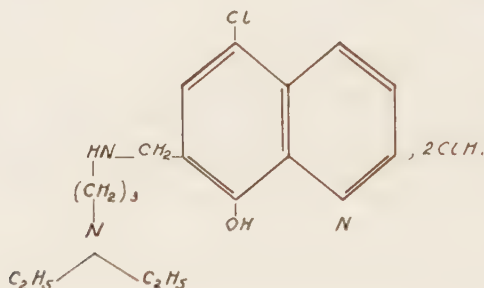
Ces deux médicaments peu toxiques et généralement bien tolérés n'ont donné que de faibles résultats dans l'amibiase intestinale : en revanche, ils sont utilisés avec succès dans l'amibiase hépatique.

L'association chloroquine-yatrène (*résotrène*) a été utilisée avec succès dans les formes intestinales de l'amibiase : elle est administrée

seule ou avec des antibiotiques. Il faut redouter, cependant, des intolérances digestives qui sont l'inconvénient majeur de cette thérapeutique.

— C.I. 433 :

Ce produit tout à fait récent est le dichlorhydrate de 5-chloro 7-(3-diéthylaminopropylaminométhyl) 8-oxyquinoléine, répondant à la formule :



Nous avons effectué une étude expérimentale *in vitro* et *in vivo* du pouvoir amœbicide de cette substance.

In vitro, nos expériences ont consisté en la détermination, selon notre technique habituelle, des concentrations léthale et inhibitrice sur des cultures d'amibe dysentérique. Le C.I. 433 manifeste ainsi une forte activité qui, comparée à celle de l'émétine, n'est que dix fois moindre.

In vivo, nous avons étudié l'action curative du C.I. 433 dans l'amibiase spontanée du Hamster déterminée par *Entamoeba criceti*. Le produit administré quotidiennement, pendant cinq jours consécutifs, exerce une bonne activité pour des doses allant de 150 à 200 mg/kg ; l'activité s'étend aussi aux flagellés de l'intestin du Hamster.

Toutes ces expériences sont d'ailleurs exposées en détail un peu plus loin, dans le présent travail.

En clinique, les premiers résultats obtenus avec le C.I. 433 sont très satisfaisants ; le produit s'administre par la voie buccale, seul ou en association avec d'autres médicaments. Actuellement, l'expérimentation se poursuit encore avec succès, et ceux-ci semblent devoir faire réserver à ce médicament une bonne place dans l'arsenal anti-amibien.

— *Milibis* ou *glycopiarsol* :

Le glycopiarsol est un dérivé arsenico-bismuthique. Administré par la voie buccale, il donne d'assez bons résultats, quoique inconstants, dans l'amibiase intestinale. Il faut redouter aussi quelques intolérances digestives généralement bénignes.

Toutefois, il est intéressant de noter que ce médicament a été préconisé en chimioprophylaxie antiamibienne, utilisé seul ou associé à la chloroquine.

— *Arsthinol* (*balarsen*, *amœbal*) :

L'arsthinol, dérivé de l'AS III et du mercaptopropanol ou B.A.L., est surtout utilisé dans l'amibiase subaiguë et chronique, ou comme traitement de consolidation après l'émétine ou les antibiotiques.

Des accidents d'intolérance peuvent survenir cependant, dans plus de 10 p. 100 des cas ; aussi les contre-indications de ce produit sont-elles les mêmes que celles des autres dérivés arsenicaux (lésions rénales et cardiaques).

— *Polybenzarsol* ou *benzodol* :

C'est l'acide poly (méthylène-4 hydroxybenzène-arsonique). Corps toxique par la voie buccale, le benzodol a donné de bons résultats dans l'amibiase intestinale.

3) DÉRIVÉS DE LA DICHLORACÉTAMIDE

— *Win 5047* ou *mantomide* :

Ce corps manifeste un fort pouvoir amœbicide, aussi bien *in vitro* (1/80.000^e) qu'*in vivo* dans l'amibiase spontanée du Hamster.

Parfaitement toléré par l'Homme, il a fourni les meilleurs résultats en association avec la fumagilline et l'érythromycine.

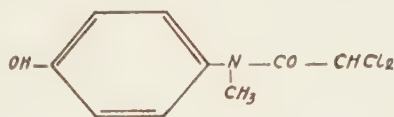
Un autre dérivé voisin, le *mébinol* ou *chlorophénoxamide*, est encore plus actif *in vitro* ; il a été utilisé dans toutes les formes de l'amibiase intestinale et en particulier dans les formes chroniques. Administré par la voie buccale, le produit est bien toléré.

4) ACÉTANILIDES SUBSTITUÉS

— *Entamide* ou *diloxanide* :

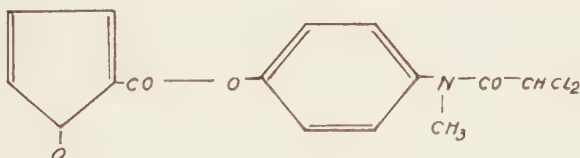
L'entamide possède une action amœbicide très marquée. Il tue les amibes de culture à une concentration aussi faible que 1 pour

1 à 10 millions. Administré par la voie buccale, il est généralement bien toléré et son action se montre surtout intéressante dans le traitement des formes chroniques : l'entamide possède en effet une action spécifique sur les kystes.



Le traitement commande parfois deux cures successives, et dans le cas de l'amibiase aiguë, il convient de lui adjoindre un antibiotique actif.

Bien que peu soluble dans l'eau, l'entamide est assez facilement résorbé dans l'intestin ; aussi la recherche de médicaments à résorption plus lente a-t-elle abouti à la préparation d'un autre dérivé, le *furoate d'entamide*, corps pour le moins aussi actif et moins toxique.



Nous avons effectué une étude comparée du pouvoir amœbicide de l'entamide et du furamide *in vitro* sur des cultures d'*E. dysenteriae* et *in vivo* sur *E. criceti* du Hamster. Nos expériences, dont les résultats sont exposés en détail plus loin, ont montré une efficacité comparable pour ces deux produits.

— Camoforme (biallylamicol) :

Le camoforme est un nouveau médicament qui, du fait de sa lente élimination et de sa rétention prolongée dans les tissus, permet un traitement électif des complications viscérales de l'amibiase.

Actif *in vitro* (1/50.000^e) et *in vivo* (chez la Souris et le Rat), ce produit a également fourni d'excellents résultats dans les essais cliniques.

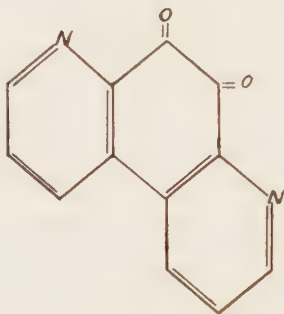
Sa toxicité est faible et les accidents secondaires qu'il peut provoquer (nausées, vomissements, douleurs abdominales) ne nécessitent généralement pas l'arrêt du traitement.

Dans l'amibiase hépatique, le camoforme a permis aussi quelques succès.

5) DÉRIVÉ DE LA PHÉNANTROLINE-QUINONE

— *Entobex* (4-7 phénantroline 5-6 quinone) :

L'entobex est une substance qui offre l'avantage d'une double action, antiparasitaire et antimicrobienne. Actif *in vitro*, il manifeste aussi, chez le Rat, une bonne efficacité.



L'entobex agit dans les formes aiguës et chroniques de l'amibiase ; administré par la voie buccale, seul ou associé à la diiodo-hydroxyquinoléine, il permet d'obtenir de 60 à 90 p. 100 de guérisons définitives.

Si l'on excepte quelques réactions secondaires (vomissements, nausées), sa tolérance est satisfaisante.

6) DIVERS

Parmi les dérivés iodiques solubles, citons encore :

— *L'iodobenzométhylformine* ou *iodaseptine*, qui en injections ou perfusions intraveineuses est surtout active dans l'amibiase hépatique.

— Le *iogol*, médicament utilisé dans l'amibiase colique.

— Et enfin le *protistène*, qui a été utilisé dans le traitement de l'amibiase intestinale.

TROISIEME GROUPE ANTIBIOTIQUES

A l'origine, les antibiotiques ne sont pas apparus comme directement intéressants pour la thérapeutique antiamibienne ; et dans une certaine mesure, on peut presque dire qu'ils furent plutôt utilisés en

faveur des amibes, du moins dans leurs milieux de culture. En effet, si l'on sait que les amibes des cultures ne se développent bien qu'en présence de bactéries associées, l'on observe aussi que la prolifération excessive de ces bactéries est une entrave à la culture ; et ce fut précisément pour réduire une telle prolifération que l'on a d'abord fait appel à la pénicilline et à d'autres antibiotiques ; par la suite, seulement, à la faveur d'une telle utilisation, on découvrit l'action amœbicide directe de certaines de ces substances.

Il est possible de distinguer deux étapes dans la thérapeutique antiamibienne par les antibiotiques.

— Dans un premier temps, les antibiotiques sont considérés comme des médicaments adjuvants, à associer aux antiamibiens spécifiques, et ont pour rôle d'agir essentiellement sur la flore bactérienne associée.

En effet, les nombreuses expériences de DESCHIENS, PHILLIPS, WOLFE, BARTGIS avaient mis l'accent sur l'importance du « complexe amibe-bactéries » dans la pathogénie de l'amibiase ; aussi HARGREAVES, en 1945, et BLANC et SIGUIER avaient-ils insisté sur l'utilité d'associer les antibiotiques et les sulfamides au traitement émélinien spécifique.

— Puis ce fut la découverte des propriétés amœbicides de certains antibiotiques, et ceux-ci deviennent alors des médicaments spécifiques de l'amibiase.

L'arsenal antiamibien comporte actuellement de nombreux antibiotiques. Nous nous bornerons ici à en faire une rapide énumération.

I) ANTIBIOTIQUES NON AMŒBICIDES

— *Pénicilline et streptomycine* :

Uniquement actifs sur la flore associée.

— *Néomycine* :

Utilisée surtout comme adjuvant de la médication par la chloroquine et la diiodohydroxyquinoléine.

— *Erythromycine* :

Paraît exercer aussi une action très faiblement amœbicide.

— *Spiramycine* :

Utilisée en association avec la diphétarsone et donnant de bons résultats dans toutes les formes intestinales aiguës ou chroniques.

II) ANTIBIOTIQUES PLUS OU MOINS ACTIFS SUR L'AMIBE ET AMOEBICIDES SPECIFIQUES

— *Chlortétracycline* :

Possède une faible action sur les amibes de culture, mais semble plus efficace sur les amibes végétatives ou kystiques parasites. L'action antibiotique est très nette sur la flore bactérienne associée, et les meilleurs résultats cliniques ont été obtenus en association avec l'émétine.

— *Oxytétracycline* :

Cet antibiotique à large spectre est aussi un amœbicide direct efficace. Utilisé seul, comme thérapeutique d'attaque, il est déjà très efficace ; mais les observations cliniques montrent que l'association avec un alcaloïde (émétine, conessine) renforce favorablement ses effets spécifiques et les prolonge.

L'on connaît aussi pour l'oxytétracycline bien d'autres associations thérapeutiques, plus ou moins efficaces, telles les associations avec de récents antibiotiques comme l'oléandomycine et la novobiocine.

— *Carbomycine* :

Elle est surtout utilisée en association avec l'oxytétracycline.

— *Fumagilline* :

Les propriétés amœbicides directes de cet antibiotique ont été démontrées par de nombreux travaux. C'est actuellement le plus actif de tous les amœbicides connus, du moins *in vitro* ; elle inhibe le développement des cultures à des concentrations aussi faibles que 1 pour 4 à 100 millions. La fumagilline est également efficace dans l'amibiase humaine. Malheureusement, ce médicament n'est pas dépourvu d'inconvénients, et les accidents d'intolérance qu'il provoque (nausées, vomissements, urticaire) obligent à une surveillance médicale très attentive.

Son utilisation à faibles doses et en association avec un bactériostatique semble la plus judicieuse.

— *Colisan* :

Le colisan est un antibiotique encore mal connu, qui a été isolé à partir d'une souche bactérienne provenant des ganglions mésentériques d'une malade ayant succombé à un iléus paralytique. Cet antibiotique a la remarquable propriété de lyser les protozoaires tels

que *Paramecium candatum* et *Entamœba dysenteriaë*. Il exerce, en outre, des propriétés spasmolytiques sur la musculature lisse de l'intestin.

Le colisan a déjà permis plusieurs guérisons dans des cas d'amibiase colique et chronique ; si l'on excepte quelques intolérances bénignes (troubles intestinaux), il paraît assez bien supporté.

Cependant de nouveaux travaux sont encore nécessaires pour faire connaître l'efficacité exacte de ce produit.

— *Protomycine* :

Récemment isolée d'une culture de *Streptomyces*, la protomycine est un antibiotique peu toxique et doué d'une activité amœbicide directe.

Elle s'est montrée très efficace dans ses essais de laboratoire, mais actuellement, il semble prématuré pour se prononcer sur son activité clinique.

— *Paromomycine* :

La paromomycine ou humatine est un antibiotique qui a été isolé à partir d'un streptomyces tellurique : *Streptomyces rimosus paromocinus*.

Aussi bien *in vitro* que dans l'amibiase expérimentale du Rat, la paromomycine s'est révélée très efficace ; elle exerce une action amœbicide directe.

Chez l'Homme, utilisée sous forme de sulfate et administrée par la voie buccale, la paromomycine a donné lieu à de nombreuses études. Dans l'ensemble, il ressort que ce produit est très efficace dans les formes aiguës de l'amibiase colique ; les guérisons sont rapides et semblent définitives.

Le produit semble un peu moins actif dans les formes chroniques.

Administré par la voie buccale, la seule utilisable, le médicament est bien supporté.

Il faut évidemment attendre de nouvelles confirmations de l'efficacité de ce produit ; toutefois, étant donné les premières observations, il n'est pas exagéré de dire qu'il constitue actuellement une des plus intéressantes acquisitions de la thérapeutique antiamibienne.



Au terme de cet exposé, redisons que notre désir n'a été que d'effectuer un bref rappel des principaux médicaments de l'amibiase ;

ceux-ci montrant d'ailleurs, par leur diversité de structure et d'action, les nombreuses particularités auxquelles doivent satisfaire les techniques d'essais *in vitro*.

Pour des détails plus précis, particuliers à chaque médicament et concernant les essais cliniques, la conduite du traitement ou la posologie, l'on pourra se rapporter aux récentes communications de CAVIER [15, 16, 17] dont nous avons tiré l'essentiel de notre documentation.

II. — QUELQUES TECHNIQUES D'ESSAIS

Pour la recherche de l'activité amœbicide, de nombreuses techniques ont été étudiées par différents auteurs. C'est de l'étude de quelques-unes de celles-ci que nous avons dégagé les idées directrices qui nous ont guidé dans le choix et la mise au point de celles que nous présentons.

Il nous a donc semblé logique, ici, de résumer les principales de ces techniques.

1) METHODE DE LAIDLAW - DOBELL - BISCHOP

[52]

A la suite des nombreux résultats contradictoires fournis, pour l'émétine, par les expériences *in vitro* de KOFOID et WAGNER (1925), de VOGEL, de SAUTET (1927), LAIDLAW-DOBELL et BISCHOP incriminent les milieux diphasiques utilisés pour ces essais. Ils montrent, en effet, que l'émétine ajoutée dans ces milieux ne subsiste pas en totalité dans la phase liquide, mais qu'elle pénètre aussi dans la phase solide en quantité indéterminée ; cette fixation étant, au surplus, très variable selon que l'on utilise des milieux à l'œuf ou au sérum coagulé.

LAIDLAW-DOBELL et BISCHOP mettent alors au point une technique comportant comme milieu d'épreuve une phase uniquement liquide, et constituée par une solution de sérum de Cheval dans du liquide de Ringer (1 partie pour 8 parties), additionnée d'amidon de riz et tamponnée par un phosphate alcalin.

Grâce à leur technique, les auteurs cherchent à déterminer, pour chaque produit étudié, la concentration qui empêche le développement des cultures.

II) METHODE DE SAINT JOHN

[86]

L'auteur, utilisant un milieu liquide à base de poudre de cœur de Bœuf, adopte une technique avec laquelle il détermine aussi, pour chaque produit, la concentration inhibitrice.

Le mérite des expériences de SAINT JOHN est d'avoir mis en relief le rôle important joué par la condition ionique du milieu sur la valeur des résultats obtenus dans l'essai *in vitro*. L'auteur montre, en effet, qu'un produit manifeste généralement son efficacité pour une concentration environ 10 à 20 fois plus faible en milieu alcalin qu'en milieu acide.

SAINT JOHN met ainsi en garde contre certaines erreurs qui sont dues aux variations du pH.

III) METHODE DE DOBELL

[35]

En 1947, comme de nos jours d'ailleurs, la culture pure de l'amibe dysentérique n'était pas réalisée ; aussi DOBELL, désireux de distinguer pour un corps l'activité amœbicide directe de l'activité indirecte qu'il est capable d'exercer par suite d'une action sur la flore associée vitale, met au point une technique où il utilise l'association : *E. dysenteriae*-*Escherichia coli*, en culture sur le milieu liquide de DOBELL-LAIDLAW-BISCHOP.

La mise en œuvre de la technique comporte plusieurs temps et quelques particularités de culture ; mais, grâce à cette méthode, DOBELL parvient à déterminer le pouvoir inhibiteur direct de certains produits, lorsque ceux-ci ne se montrent pas actifs sur *Escherichia coli*.

IV) METHODE DE PIETTE

[68]

PIETTE ayant fait observer, fort justement, qu'il n'est pas convenable d'utiliser pour les essais *in vitro* des milieux monophasiques si ceux-ci ne sont pas de bons milieux de culture (en particulier celui de DOBELL-LAIDLAW-BISCHOP), adopte de préférence, pour ses expériences, le milieu diphasique.

Cependant, conscient de la cause d'erreur que constitue l'emploi d'un tel milieu, il entreprend d'y remédier et, à cet effet, détermine pour les deux produits étudiés, l'émétine et la conessine, et à l'aide de dosages précis, les véritables concentrations actives restant dans la phase liquide.

De plus, et il est le premier à l'avoir fait, il étudie deux ordres de fait ; ce sont :

- d'une part, l'action de l'émétine et de la conessine sur le départ des cultures ;
- et d'autre part, l'action de ces mêmes produits sur des cultures d'amibes de quatre jours. Il fixe la durée d'action à vingt-quatre heures.

V) METHODE DE GUIGNARD

[43]

Le milieu ici utilisé est aussi le milieu diphasique de DOBELL-LAIDLAW.

L'auteur prépare des milieux de culture renfermant les dilutions du produit à essayer, et une fois ces milieuxensemencés, il les examine au fur et à mesure, quotidiennement, jusqu'à la mort des amibes. Il note pour chaque tube la richesse de la culture, la mobilité des amibes, leur morphologie et leur pouvoir phagocytaire vis-à-vis de l'amidon.

GUIGNARD détermine finalement la concentration du produit qui arrête le développement de la culture, ceci au bout d'un temps qu'il note.

Par ailleurs, GUIGNARD, voulant réaliser une brusque mise en contact de la solution active avec les amibes, utilise aussi une autre technique.

Il ensemence des tubes avec une souche d'*E. dysenterix*, en vérifie la culture le deuxième jour et alors, leur soustrayant toute la phase liquide surnageant le dépôt d'amidon, il la remplace par 2 ml de solution neuve, renfermant différentes concentrations du produit à essayer.

Comme dans la première technique, il cherche la concentration du produit qui inhibe la culture et il note le temps nécessaire pour ce résultat.

L'auteur pratique ses essais comparativement avec l'émétine.

SIXIEME METHODE

Plusieurs auteurs : THOMPSON, DUNN, BAYLES, REINERTSON [94], dans le but d'étudier le mode d'action des antibiotiques, adoptent une technique sur un milieu liquide, à base d'infusion de jaune d'œuf.

Ils étudient ainsi, pour ces corps, les concentrations actives après vingt-quatre heures de contact à 37°C, et en tenant compte du fait que l'opération est conduite en aérobiose ou anaérobiose.

D'une manière générale, et l'intérêt de cette technique est de l'avoir montré, il ressort des expériences que les antibiotiques sont moins actifs sur l'amibe en anaérobiose qu'en aérobiose.

Ce fait trouve d'ailleurs une explication logique dans l'hypothèse de BRADIN et HANSEN, hypothèse selon laquelle il apparaît que les bactéries, bien que de toute façon nécessaires aux amibes en culture, seraient moins vitales pour celles-ci en anaérobiose (sous couche de vaseline par exemple) que dans des conditions permettant l'aération du milieu [10].

Une telle constatation confirme le rôle antioxygène de la flore associée et souligne, du même coup, l'importance de l'anaérobiose dans l'évolution de la culture.

SEPTIEME METHODE

Mentionnons aussi une technique originale qui est utilisée, dès 1943, par JEAN-BAPTISTE [46] avec *Entamoeba invadens*, et plus tard par BONNIN, MORETTI, GUIGNARD [9], et par KRADOFFER et NEIPP [50] avec *Entamoeba dysenteriae*.

Elle consiste à étudier l'action amœbicide sur des trophozoïtes de culture placés entre lame et lamelle. On opère de la façon suivante :

- sur une lame, une goutte du produit en solution est additionnée d'une goutte de culture d'amibes vivantes. On recouvre d'une lamelle, on lute à la paraffine et on porte à 37°C à l'étuve de FOOT.

Par cette technique, les auteurs cherchent à déterminer, en fonction de la concentration, le temps au bout duquel les protozoaires sont tués.

L'interprétation des résultats est fournie par l'observation simultanée d'amibes placées dans les mêmes conditions, dans une goutte de sérum physiologique. Dans les essais témoins, les amibes restent

vivantes et mobiles pendant cinq à six heures, et ce temps est suffisant pour permettre l'étude de leur comportement sous l'effet des produits amœbicides.

VIII) METHODE DE DE CARNERI

[13, 57]

L'auteur utilise le milieu liquide de PAVLOVA qu'il répartit à raison de 4 ml par tube. Il ajoute le produit à essayer et ensemence ensuite avec 0,4 ml d'une culture mixte d'amibes et de bactéries associées. La lecture des résultats s'effectue après vingt-quatre heures et quarante-huit heures de séjour à l'étuve à 37°C.

A l'aide de cette technique, l'auteur détermine, pour chaque corps essayé, la concentration qui inhibe la culture en vingt-quatre ou quarante-huit heures.

COMMENTAIRES

a) D'autres auteurs ont également réalisé des essais *in vitro* en utilisant divers procédés : nous nous sommes volontairement limités à une présentation des techniques les plus représentatives, et en particulier de celles qui nous ont semblé comporter d'utiles renseignements pour le but que nous poursuivions.

b) Dans la suite de notre exposé, nous n'insisterons pas sur les résultats discordants fournis par les techniques précitées ; il est logique que les différences de composition des milieux adoptés dans ces techniques et les diverses particularités propres à chacune d'entre elles aient déterminé de telles variations.

Nous nous bornerons à exposer, d'une manière générale, les *points essentiels* qu'il importe de préciser dans l'essai *in vitro*, à noter quelques *erreurs* contre lesquelles l'étude précédente nous aura mis en garde et aussi les *qualités et garanties* que, selon nous, doit présenter une bonne technique d'essai.

III. — CONDITIONS DE L'ESSAI "IN VITRO"

A. — POINTS A PRÉCISER

De l'étude des précédentes techniques et des résultats très relatifs qu'elles fournissent, il ressort plusieurs observations dont la logique conséquence est qu'il est indispensable de préciser le protocole de l'expérimentation *in vitro*, et de considérer plus particulièrement les points suivants :

- a) *La composition du milieu de culture* utilisé et le mode de culture.
- b) *La durée de contact du médicament* avec l'amibe.
- c) *La nature du critère choisi pour évaluer l'activité amœbicide* ; action inhibitrice au départ des cultures, ou action léthale sur des cultures déjà florissantes.
- d) *Le mode d'évaluation des résultats* :
 - pour l'activité inhibitrice : soit l'inhibition absolue, soit l'inhibition en fonction de la durée de l'action ;
 - pour l'action léthale : soit une action léthale partielle, soit l'action léthale 100 pour 100.

B. — COMPLICATIONS OU ERREURS A ÉVITER

Compte tenu des travaux des auteurs qui nous ont précédé, les principales causes d'erreurs ou complications qui nous semblent devoir être évitées sont les suivantes :

1) L'UTILISATION D'UN MILIEU DIPHASIQUE

L'objectif de l'essai *in vitro* est la détermination précise de la concentration amœbicide pour un produit donné.

Or, dans un milieu diphasique, en raison de l'inégale répartition du produit entre les deux phases due, comme nous l'avons vu, à

son absorption plus ou moins grande par la phase solide protéique, il est impossible de connaître la concentration réellement efficace restant dans la phase liquide.

Le procédé du dosage des produits dans les phases liquide et solide est, certes, un remède ; mais il n'est pas toujours facilement applicable et sa mise en œuvre comporte des difficultés techniques peu compatibles avec l'expérimentation en série.

2) L'UTILISATION D'UN MILIEU LIQUIDE PEU FAVORABLE A LA CULTURE DE L'AMIBE

Il est évident, comme l'a déjà noté PIETTE, qu'essayer la résistance des amibes vis-à-vis de certains produits, alors que celles-ci ne sont pas dans leurs meilleures conditions de vie, ne peut conduire qu'à des résultats incertains quant à l'efficacité de ces produits.

3) LA CULTURE PURE MIXTE

Etant donné qu'*E. dysenteriae* ne pousse bien qu'en présence d'une flore bactérienne associée, il nous semble que la confrontation des médicaments avec les amibes peu vigoureuses d'une culture pure mixte (exemple : *E. dysenteriae* et *Trypanosoma cruzi*) présente le même risque que précédemment.

D'autre part, une technique utilisant la culture pure mixte est d'une mise en œuvre délicate et peu pratique, et elle ne permet pas d'étudier toutes les substances indifféremment. Il est impossible, en effet, de conduire une telle expérience sur un médicament, si celui-ci est à la fois amœbicide et trypanocide.

4) UNE DURÉE D'ACTION PROP COURTE qui peut, dans certains cas, se montrer insuffisante pour permettre au médicament d'exercer son action si celle-ci est lente à se manifester.

5) LA DÉTERMINATION D'UNE CONCENTRATION INHIBITRICE EN FONCTION D'UN TEMPS VARIABLE

Ici, la durée de contact du médicament n'est pas fixée à l'avance ; il s'agit de rechercher la concentration qui inhibe la culture de l'amibe ; on note simplement le temps nécessaire à ce résultat.

A notre avis, les inconvénients d'une telle technique sont les suivants :

- a) On est conduit à effectuer des observations quotidiennes, du début à la fin de l'expérience.

- b) Selon la durée de contact, la concentration active peut être variable pour un même produit.
- c) Pour deux produits essayés, les efficacités trouvées, résultant de durées d'action différentes, ne sauraient être logiquement comparables.

6) LA DÉTERMINATION D'UNE ACTIVITÉ LÉTHALE PARTIELLE

Nous avons le même sentiment en ce qui concerne la détermination de l'activité léthale partielle. D'autant plus qu'il est très difficile, presque impossible même dirons-nous, d'évaluer avec précision, par simple examen microscopique, le pourcentage de mortalité dans une culture d'amibes : l'état de mort ou de survie des amibes n'étant pas toujours exprimé par des allures morphologiques nettement différenciées.

CONCLUSION

En définitive, ces quelques considérations, auxquelles nous pouvons ajouter les influences non négligeables de la *flore associée* (indéterminée et propre à chaque milieu et à chaque souche), de l'*âge de la souche* (en général plus résistante lorsque depuis plus longtemps adaptée sur un milieu) et de la *quantité d'amibesensemencées* mettent en garde contre la relativité des résultats des expériences *in vitro*.

Il est donc permis d'affirmer qu'un maximum de validité pour des résultats ne peut être garanti que dans un protocole d'expérimentation standard et rigoureux.

C'est en nous conformant à ces remarques que nous avons essayé de mettre au point les deux techniques d'essais décrites dans le paragraphe suivant.

IV. — TECHNIQUES PERSONNELLES D'ESSAI "IN VITRO"

Avant d'entreprendre l'exposé des techniques que nous proposons, il nous semble nécessaire de préciser les *conditions* dans lesquelles nous avons tenu à effectuer nos expériences.

a) Nous avons choisi d'effectuer les essais sur un *milieu liquide* : les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA sont ceux que nous avons retenus.

Autant que possible, nous avons toujours tâché d'étudier chaque nouvelle substance sur ces deux milieux à la fois.

b) En nous fondant sur les travaux antérieurs de PIETTE, nous avons retenu *deux modalités d'évaluation* de l'activité amœbicide :

1° L'évaluation du *pouvoir d'inhibition* sur le départ des cultures.

2° La détermination de l'*action léthale* sur des amibes de culture.

Pour le *critère d'évaluation* des résultats et la *durée de contact* du médicament, nous avons adopté :

— dans le premier essai : l'*inhibition absolue*, observée le troisième jour de la culture ;

— dans le second : les *actions léthales 100 pour 100*, sur une culture d'amibes âgée de trois jours, après *vingt-quatre heures et quarante-huit heures* de contact.

c) Etant donné la relativité des chiffres fournis par l'expérimentation *in vitro*, nous avons jugé indispensable d'effectuer les essais *comparativement* à un produit éprouvé, et nous avons choisi l'émétine. Cette substance nous a donc servi de terme de comparaison à chaque nouvelle expérience.

d) Nous avons effectué, autant que possible, des essais comparatifs et simultanés sur deux souches différentes, de manière à réduire les causes d'erreur dues à un facteur individuel inhérent à l'amibe elle-même.

e) Toutes nos expériences ont été effectuées sur des amibes normalement cultivées, en association avec une flore bactérienne indétournée, et toujours en présence d'amidon de riz.

I. — ÉPREUVE D'INHIBITION AU DÉPART DE LA CULTURE

PRINCIPE

Par cette technique, nous déterminons la plus grande dilution (concentration minimale) pour un produit donné qui, après un temps de contact de trois jours à 37°C et après repiquages, empêche la reprise de la culture.

- *Milieux de culture utilisés* : milieux de BALAMUTH ou de PAVLOVA.
- *Ensemencement* : population d'environ 10.000 amibes.
- *Lecture des résultats* : examen microscopique et subculture.

TECHNIQUE ET PREPARATION DE L'ESSAI

La composition des tubes d'épreuve doit être la suivante :

— Milieu de culture	4,5 ml
— Dilution de produit	0,25 ml
— Culture d'amibes	0,25 ml (environ 10.000 amibes)

• *Milieu de culture*

Préparer des tubes de culture renfermant exactement 4,5 ml des milieux monophasiques de BALAMUTH ou de PAVLOVA. Ajouter une pincée d'amidon de riz dans chaque tube de milieu BALAMUTH (à ce stade de la préparation des milieux, le milieu de PAVLOVA renferme déjà l'amidon).

Nombre de tubes :

En moyenne, pour 8 « tubes d'épreuves », compter 2 « tubes témoins » de culture.

• *Dilution du produit*

Préparer une solution ou suspension mère du produit à essayer dans l'eau physiologique (pour les suspensions, ajouter 1 p. 100 de tween 80).

Puis, à partir de la solution mère, préparer les dilutions correspondantes aux concentrations que l'on veut essayer, c'est-à-dire en tenant compte du fait que les solutions que l'on introduira dans chaque tube (à savoir 0,25 ml) seront finalement diluées au 1/20^e.

A titre d'exemple, le tableau suivant indique les correspondances entre les dilutions préalables du produit et les concentrations définitives obtenues par addition de 0,25 ml de ces dilutions, dans les tubes d'épreuve :

<i>Dilutions</i>	<i>Concentrations actives</i>
1/100 ^e	1/2.000 ^e
1/200 ^e	1/4.000 ^e
1/250 ^e	1/5.000 ^e
1/500 ^e	1/10.000 ^e
1/1.000 ^e	1/20.000 ^e
1/10.000 ^e	1/200.000 ^e

• *Culture d'amibes*

Prévoir, pour le jour de départ de l'essai, un volume suffisant de cultures d'amibes, âgées de trois ou quatre jours (le milieu de culture doit être le même que celui de l'essai); ajuster ce volume de telle manière qu'il y ait environ 10.000 amibes dans 0,25 ml.

Numération des amibes à cellule de Nageotte :

Sur une suspension homogène des amibes provenant du mélange de plusieurs cultures, faire une numération préalable ; puis, selon le cas, effectuer soit une dilution de la suspension (par addition de milieu neuf), soit une concentration de celle-ci (par décantation et élimination de surnageant), de manière à obtenir fialement une suspension renfermant, approximativement, 10.000 amibes par 0,25 ml. Pratiquement, une telle densité correspond à une numération moyenne de 60 à 65 amibes pour une bande de la cellule de Nageotte.

CONDUITE DE L'EXPERIENCE

• *Mise en train (premier jour)*

a) *Introduction du produit* : introduire 0,25 ml de chaque dilution respectivement dans chaque « tube d'épreuve » ; ajouter 0,25 ml d'eau physiologique dans les « tubes témoins » de la culture. Agiter légèrement pour bien répartir le produit dans le milieu de culture.

b) *Introduction des amibes* : à l'aide d'une seringue à insuline, stérilisée, introduire dans tous les tubes, y compris les témoins, 0,25 ml d'inoculum renfermant environ 10.000 amibes.

— *Remarque* : au moment du prélèvement de l'inoculum d'amibes, agiter la culture avec la pointe de l'aiguille, de manière à réaliser l'aspiration homogène des amibes et de l'amidon.

On peut également utiliser une pipette graduée de 1 ml ; pour la commodité de l'opération, se servir alors de la pipette comme d'une pipette Pasteur : à cet effet, avant stérilisation, elle aura été bouchée à son extrémité non effilée par du coton, et au moment de son utilisation, on l'ajuste à un tube Helmtz.

c) Agiter légèrement les tubes, pour bien disperser les amibes ; et porter à l'étuve à 37°C.

• *Lecture des résultats (troisième jour)*

a) Examiner au microscope le contenu de chaque tube : prélèvement, frottis sur lame préalablement chauffée à 37°C (platine chauffante), recouvrement avec grande lamelle (22 × 32 mm) et examen microscopique.

— *Remarque* : observer d'abord les « tubes témoins » qui doivent présenter l'aspect de belles cultures ; puis examiner les « tubes d'épreuve » en commençant de préférence par les plus faibles dilutions de produit.

b) En cas de doute, pratiquer une « *subculture* », que l'on examine alors au bout de trois jours à 37°C.

• *Expression des résultats*

L'activité amœbicide est exprimée par la plus grande dilution (concentration minimale) qui empêche le départ de la culture de l'amibe.

II. — ÉPREUVE DE L'ACTION LÉTHALE SUR DES CULTURES DE TROIS JOURS

PRINCIPE

Par cette technique, nous déterminons les deux plus grandes dilutions pour un produit donné (concentrations minimales) qui tuent, respectivement, en vingt-quatre et quarante-huit heures, toutes les amibes d'une culture de trois jours à 37°C.

- *Milieux de culture utilisés* : milieux de BALAMUTH ou de PAVLOVA.
- *Ensemencement* : population d'environ 10.000 amibes.
- *Lecture des résultats* : examens microscopiques et subcultures.

TECHNIQUE ET PREPARATION DE L'ESSAI

Comme précédemment, la répartition des différents constituants dans les « tubes d'épreuve » doit être les suivantes :

— Milieu de culture	4,5 ml
— Culture d'amibes	0,25 ml
— Dilution du produit	0,25 ml

- *Milieu de culture*

Préparer des tubes de culture en nombre suffisant renfermant exactement 4,5 ml des milieux de BALAMUTH ou de PAVLOVA. Prévoir en moyenne deux « tubes témoins » de culture pour 8 « tubes d'épreuve ».

- *Culture d'amibes*

Pour le jour de départ de l'essai, prévoir un volume suffisant de cultures d'amibes âgées de trois ou quatre jours (le milieu de culture doit être identique au milieu de l'essai). Comme dans l'essai précédent, amener ce volume à une richesse en amibes voisine de 10.000 amibes par 0,25 ml.

- *Dilution du produit*

Pour le troisième jour de l'essai, préparer une solution ou suspension mère du produit à essayer, et à partir de celle-ci, la gamme de dilutions choisies.

CONDUITE DE L'EXPERIENCE

- *Mise en train*

Premier jour :

a) *Introduction des amibes* : introduire 0,25 ml de culture d'amibes (environ 10.000 amibes) dans tous les tubes, y compris les témoins. Agiter légèrement : porter à l'étuve à 37°C.

Troisième jour :

a) *Introduction du produit* : vérifier la vitalité de la culture dans chacun des tubes ; elle doit être à peu près égale partout. Introduire

alors, respectivement dans chaque « tube d'épreuve », 0,25 ml de chaque dilution du produit. Les « tubes témoins » reçoivent 0,25 ml de sérum physiologique. Agiter légèrement et porter à l'étuve à 37°C.

• *Lecture des résultats*

Le quatrième et le cinquième jour, soit après vingt-quatre et quarante-huit heures de contact, faire des examens microscopiques du contenu de chaque tube : observer la vitalité, la forme, le nombre des amibes, et retenir les plus grandes dilutions pour lesquelles toutes les amibes auront été tuées.

Si l'appréciation est douteuse, on pratique la *subculture* pour contrôler le résultat.

• *Expression des résultats*

Les résultats retenus sont les plus grandes dilutions (concentrations minimales) de produit qui déterminent la mort de toutes les amibes après vingt-quatre heures et après quarante-huit heures.

L'intérêt de ces deux résultats réside dans le fait qu'ils donnent une idée de la vitesse d'action du produit.

— *Remarque* : pendant la durée de l'essai, il est préférable de boucher les tubes, en plus du coton, avec des capsules en caoutchouc, de manière à éviter une légère cause d'erreur due à l'évaporation.

V. — EXPERIMENTATION AVEC QUELQUES PRODUITS

Dans ce paragraphe, nous présentons quelques-uns des résultats obtenus, à l'aide des précédentes techniques, avec les produits que nous avons essayés.

Pour la clarté de la présentation, nous avons préféré exposer, d'une part, les essais de l'inhibition au départ des cultures, puis d'autre part, ceux de l'action léthale sur les amibes

L'émétine nous a servi de produit de référence dans la plupart de nos expériences. Elle fut donc essayée à plusieurs reprises ; aussi les chiffres la concernant expriment-ils des résultats d'essais effectués à des moments différents et sur des souches diverses ; de là, leur légère variabilité.

— *Remarque* : dans nos tableaux, nous avons noté les quantités actives de produit sous forme de *fractions*, exprimant les *dilutions* dans le milieu de culture. Cependant, il est parfois plus expressif de connaître ces quantités, sous forme de *concentration par ml* de milieu ; pour cette raison, nous donnons dans les *Tableaux I* et *II*, en *mg* et *microgrammes par ml*, la correspondance des principales dilutions que nous avons utilisées.

A. — ESSAIS DE L'INHIBITION AU DÉPART DES CULTURES

Rappelons que l'essai consiste à ensemercer, le premier jour, environ 10.000 amibes dans les tubes renfermant le milieu de culture additionné d'une concentration déterminée du produit à essayer. Le troisième jour, on procède à l'examen microscopique et éventuellement à la subculture. Les résultats sont présentés sous forme de tableaux.

Dilution dans le milieu	Concentration dans 1 ml de milieu	
	(en μg)	(en mg)
1/100	10.000	10
1/1.000	1.000	1
1/5.000	200	0,2
1/10.000	100	0,1
1/50.000	20	0,02
1/100.000	10	0,01
1/500.000	2	0,002
1/1.000.000	1	0,001
1/5.000.000	0,2	
1/10.000.000	0,1	
1/50.000.000	0,02	

TABLEAU I

Dilution dans le milieu	Concentration dans 1 ml de milieu	
	(en μg)	(en mg)
1/5.000	200	0,2
1/10.000	100	0,1
1/20.000	50	0,05
1/40.000	25	0,025
1/80.000	12,5	0,0125
1/160.000	6,25	
1/320.000	3,12	
1/640.000	1,56	
1/1.280.000	0,78	
1/2.560.000	0,39	
1/5.120.000	0,195	
1/10.240.000	0,097	
1/20.480.000	0,048	

TABLEAU II

PREMIERE EXPERIMENTATION

Produits : *chloroïodoquine* (vioforme) et *vitamine PP*.

Ayant eu connaissance de certaines observations cliniques dans lesquelles la *vitamine PP* aurait favorisé l'action amœbicide de la *chloroïodoquine*, nous avons voulu savoir si une telle synergie se manifestait également *in vitro*.

• Première série d'essais

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : milieu de BALAMUTH.
- Souches d'amibes : la souche N.S.
- Produit : *chloroïodoquine*.

Le tableau suivant résume l'expérience et les résultats obtenus :

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/4.000	-		
1/8.000	-		
1/16.000	-		
1/32.000	-	-	X
1/64.000	+		
1/128.000	++		
Témoins	++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chloroïodoquine* + *vitamine PP* (parties égales).

L'expérience a été effectuée parallèlement à la précédente.

CONCLUSION :

Sur le milieu de BALAMUTH, la *chloroïodoquine* d'une part et la *chloroïodoquine* + *vitamine PP* d'autre part, inhibent la culture

de l'amibe à la même concentration ; la dilution active est 1 pour 32.000 et correspond à la dose de 31,2 microgrammes par ml.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/4.000	-		
1/8.000	-		
1/16.000	-		
1/32.000	-	-	X
1/64.000	+	+	
1/128.000	++		
Témoins	++		

• Deuxième série d'essais

Ce groupe comprend deux nouvelles expériences effectuées comme précédemment, mais ici sur le milieu de PAVLOVA.

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chloroïodoquine*.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/4.000	-		
1/8.000	-		
1/16.000	-		
1/32.000	-	-	X
1/64.000	++		
1/128.000	++		
Témoins	++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chloroïodoquine* + *vitamine PP* (parties égales).

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/4.000	-		
1/8.000	-		
1/16.000	-		
1/32.000	-	-	X
1/64.000	++		
1/128.000	++		
Témoins	++		

CONCLUSION :

Comme nous l'avons constaté avec le milieu de BALAMUTH, il n'y a pas de différence entre l'activité amœbicide *in vitro* de la chloroïodoquine seule ou associée avec la vitamine PP. La concentration inhibitrice dans les deux cas est 1 pour 32.000, soit 31,2 µg/ml.

Ces résultats, obtenus avec le milieu de PAVLOVA, correspondent en tous points à ceux de la première série d'essais réalisés avec le milieu de BALAMUTH.

• *Troisième série d'essais*

Les deux expériences suivantes sont analogues à celles de la deuxième série ; mais la souche d'amibes utilisée ici est différente. Il s'agit d'une souche d'amibe dysentérique qui nous avait été fournie un an auparavant par l'Institut Pasteur et que nous avons, depuis lors, régulièrement entretenue en culture sur les trois milieux que nous utilisons.

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : souche I.P.
- Produit : *chloroïodoquine*.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/4.000	-		X
1/8.000	-		
1/16.000	-	-	
1/32.000	+	+	
1/64.000	+++		
1/128.000	+++		
Témoins	+++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : souche I.P.
- Produit : chloroïodoquine + vitamine PP.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/4.000	-		X
1/8.000	-		
1/16.000	-	-	
1/32.000	+		
1/64.000	++		
1/128.000	+++		
Témoins	+++		

CONCLUSIONS GÉNÉRALES :

Des trois séries d'essais, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° L'addition de vitamine PP ne modifie nullement le pouvoir *in vitro* de la chloroïodoquine.

2° Pour nos essais, nous avons utilisé deux milieux différents et deux souches différentes : le pouvoir inhibiteur a été identique dans chaque milieu : il n'a légèrement varié que d'une souche à l'autre.

<i>Souche N.S. :</i>	<i>Concentration inhibitrice</i>
— Milieu de Balamuth	1 : 32.000
— Milieu de Pavlova	1 : 32.000
<i>Souche I.P. :</i>	
— Milieu de Balamuth	1 : 16.000
— Milieu de Pavlova	1 : 16.000

3° La souche la mieux adaptée sur nos milieux, soit la souche I.P. (cultivée depuis plus d'un an par nous-mêmes, au lieu de trois mois pour la souche N.S.), a été la plus résistante à l'action amœbicide de la chloroïodoquine.

DEUXIEME EXPERIMENTATION

Produits : *chlorhydrate d'émétine* et *chlorhydrate de 2-déhydro-émétine*.

Nous avons eu à effectuer l'étude de l'activité amœbicide de la 2-déhydroémétine, et, à cet effet, l'émétine nous a servi de terme de comparaison.

Dans un premier groupe d'essais, nous avons utilisé le milieu de BALAMUTH, et, dans un deuxième, le milieu de PAVLOVA.

• Première série d'essais

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chlorhydrate d'émétine*.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/1.000	-		
1/10.000	-		
1/100.000	-		
1/1.000.000	-	-	
1/10.000.000	-	-	X
Témoins	+++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine*.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/1.000	-		
1/10.000	-		
1/100.000	-		
1/1.000.000	-	-	
1/10.000.000	-	-	X
Témoins	+++		6

CONCLUSION :

Dans cette première série d'essais, nous avons noté l'équivalence d'action du chlorhydrate d'émétine et du chlorhydrate du 2-déhydroémétine ; leurs pouvoirs inhibiteurs se manifestant pour des concentrations inférieures à 1 pour 10 millions.

• *Deuxième série d'essais*

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chlorhydrate d'émétine*.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/1.000	-		
1/10.000	-		
1/100.000	-		
1/1.000.000	-	-	
1/10.000.000	-	-	X
Témoins	+++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *N.S.*
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine.*

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/1.000	-		
1/10.000	-		
1/100.000	-		
1/1.000.000	-	-	
1/10.000.000	-	-	X
Témoins	+++		

CONCLUSION :

Les résultats obtenus avec le milieu de PAVLOVA sont identiques à ceux que nous avons précédemment enregistrés avec le milieu de BALAMUTH. Ils confirment les très forts pouvoirs inhibiteurs du chlorhydrate d'émétine et du chlorhydrate de 2-déhydroémétine, puisqu'ils s'exercent pour des concentrations inférieures à 1 pour 10 millions.

TROISIEME EXPERIMENTATION

Produit : *le C.I. 433.*

Nous avons effectué l'étude de l'activité amœbicide *in vitro* de ce nouveau produit. Nous résumons dans les tableaux suivants les résultats des essais de l'inhibition au départ des cultures.

Cette expérimentation a été effectuée en même temps et dans les mêmes conditions que l'expérimentation précédente ; ici également l'essai du chlorhydrate d'émétine a donc servi de terme de comparaison.

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : *N.S.*
- Produit : *C.I. 433.*

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/1.000	-		
1/10.000	-		
1/100.000	-		
1/1.000.000	-	-	X
1/10.000.000	++		
Témoins	+++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : C.I. 433.

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/1.000	-		
1/10.000	-		
1/100.000	-		
1/1.000.000	-	-	X
1/10.000.000	++		
Témoins	+++		

CONCLUSIONS :

1° Le produit C.I. 433 possède une forte activité inhibitrice sur les cultures d'amibe dysentérique et l'exerce de manière identique sur les deux milieux utilisés.

2° Comparativement au chlorhydrate d'émétine, dont on connaît la très grande efficacité, le produit C.I. 433 n'est que 10 fois moins actif.

Milieu	Concentration inhibitrice	
	Emétine	C.I.433
Balamuth	1 : 10.000.000	1 : 1.000.000
Pavlova	1 : 10.000.000	1 : 1.000.000

QUATRIEME EXPERIMENTATION

Produit : *extrait total de Simarouba amara.*

Ce produit, remarquable pour son innocuité, a déjà donné de bons résultats dans le traitement de l'amibiase aiguë, utilisé seul ou en association avec les amœbicides classiques. Il agirait essentiellement *in vivo* en s'opposant à l'action histolytique de l'amibe et en favorisant la cicatrisation des lésions.

Nos expériences ont cherché à mettre en évidence, pour ce produit, une activité inhibitrice, si faible soit-elle, s'exerçant sur les cultures de l'amibe.

ESSAI N° 1 :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : *N.S.*
- Produit : *extrait de Simarouba* (poudre soluble).

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/100	-	-	X
1/200	-		
1/500	+		
1/1.000	++		
1/2.000	++		
1/5.000	++		
Témoins	++		

ESSAI N° 2 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *N.S.*
- Produit : *extrait de Simarouba.*

Concentrations	Examen microscopique	Subculture	Concentration inhibitrice
1/100	-	-	X
1/200	-		
1/500	-		
1/1.000	++		
1/2.000	++		
1/5.000	++		
Témoins	++		

CONCLUSION :

L'extrait total de *Simarouba amara* que nous avons examiné ne manifeste qu'un faible pouvoir inhibiteur, s'exerçant pour des concentrations relativement élevées du produit.

Milieu	Concentration inhibitrice
Balamuth	1 : 200
Pavlova	1 : 500

B. — ESSAIS DE L'ACTION LÉTHALE SUR LES AMIBES DE CULTURE DE TROIS JOURS

PREMIERE EXPERIMENTATION

Produits : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine et d'émétine.*

Nous avons procédé avec ces produits à plusieurs expériences successives. Nous les résumons dans les tableaux suivants :

• Première série d'essais

Cette série comprend quatre expériences effectuées simultanément, avec une même souche.

ESSAI N° 1 (*Tableau I*) :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate d'émétine.*

ESSAI N° 2 (*Tableau II*) :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine.*

RÉSULTATS :

Concentrations minimales léthales en *vingt-quatre heures.*

Milieu de culture	Temps	Chlorhydrate d'émétine	Chlorhydrate de 2-déhydroémétine
Balamuth	24 h	1 : 80.000	1 : 160.000

TABLEAU I

Chlorhydrate d'émétine

	1 ^{er} jour Ensemencement	3 ^{ème} jour		4 ^{ème} jour		5 ^{ème} jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/5.000	-		-			
2	"	+++	1/10.000	-		-			
3	"	+++	1/20.000	-		-			
4	"	+++	1/40.000	-		-			
5	"	+++	1/80.000	-	-	-		X	
6	"	+++	1/160.000	+	+	-			
7	"	+++	1/320.000	++		-			
8	"	+++	1/640.000	+++		-			
9	"	+++		+++		++			

TABLEAU II

Chlorhydrate de 2-déhydroémétine

	1er jour Ensemencement	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h. 48 h.	
1	"	+++	1/5.000	-		-			
2	"	+++	1/10.000	-		-			
3	"	+++	1/20.000	-		-			
4	"	+++	1/40.000	-		-			
5	"	+++	1/80.000	-		-			
6	"	+++	1/160.000	-		-			
7	"	+++	1/320.000	+		-		X	
8	"	+++	1/640.000	++		-			
T	"	+++		+++		++			

TABLEAU III
Chlorhydrate d'émétine

	1er jour Ensemencement	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/5.000	-		-			
2	"	+++	1/10.000	-		-			
3	"	+++	1/20.000	-		-			
4	"	+++	1/40.000	-		-			
5	"	+++	1/80.000	-	-	-		X	
6	"	+++	1/160.000	+		-			
7	"	+++	1/320.000	++		-			
8	"	+++	1/640.000	+++		-			
T	"	+++		+++		++			

TABLEAU IV

Chlorhydrate de 2-déhydroémétine

	1er jour Ensemencement	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/5.000	-		-			
2	"	+++	1/10.000	-		-			
3	"	+++	1/20.000	-		-			
4	"	+++	1/40.000	-		-			
5	"	+++	1/80.000	-		-			
6	"	+++	1/160.000	-	-	-		X	
7	"	+++	1/320.000	+		-			
8	"	+++	1/640.000	++		-			
T	"	+++		+++		+++			

ESSAI N° 3 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate d'émétine.*

ESSAI N° 4 :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine.*

RÉSULTATS :

Concentrations minimales léthales en vingt-quatre heures.

<i>Milieu de culture</i>	<i>Temps</i>	<i>Chlorhydrate d'émétine</i>	<i>Chlorhydrate de 2-déhydroémétine</i>
Pavlova	24 h	1 : 80.000	1 : 160.000

CONCLUSIONS :

1° A ce stade de l'expérimentation, étant donné les concentrations essayées, nous n'avons pu déterminer que les concentrations léthales après vingt-quatre heures.

2° Les résultats ont été identiques avec les deux milieux utilisés.

3° Le chlorhydrate de 2-déhydroémétine s'est révélé deux fois plus actif que le chlorhydrate d'émétine après vingt-quatre heures d'action.

4° Pour les deux produits, toutes les concentrations essayées ayant été efficaces après quarante-huit heures d'action, il s'est avéré nécessaire de poursuivre l'expérience avec des concentrations plus faibles, afin de parvenir à la détermination des doses minimales léthales au bout de ce temps.

• *Deuxième série d'essais*

Cette série comprend quatre nouvelles expériences effectuées comparativement, comme dans la série précédente. Toutefois, ici, les concentrations de produit essayées sont plus faibles.

ESSAI N° 1 (*Tableau I*) :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate d'émétine.*

TABLEAU I

Chlorhydrate
d'émétine

	1er jour	2ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/160.000	+	+	-		?	
2	"	+++	1/320.000	+		-			
3	"	+++	1/640.000	+		-			
4	"	+++	1/1.280.000	++		-	-		X
5	"	+++	1/2.560.000	+++		+			
6	"	+++	1/5.120.000	+++		+			
7	"	+++	1/10.240.000	+++		++			
T	"	+++		+++		++			

	1er jour	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/160.000	-	-	-		X	
2	"	+++	1/320.000	+	+	-			
3	"	+++	1/640.000	+		-			
4	"	+++	1/1.280.000	++		-	-		X
5	"	+++	1/2.560.000	+++		+	+		
6	"	+++	1/5.120.000	+++		+			
7	"	+++	1/10.240.000	+++		++			
T	"	+++		+++		++	++		

TABLEAU II

Chlorhydrate de
2-déhydroémétine

1er jour	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
	Ensemencement	Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	
1	"	+++	1/160.000	-	-	-		24 h. 48 h.
2	"	+++	1/320.000	+		-		X
3	"	+++	1/640.000	++		-		
4	"	+++	1/1.280.000	++		-		
5	"	+++	1/2.560.000	++		-	-	X
6	"	+++	1/5.120.000	++		+		
7	"	+++	1/10.240.000	+++		++		
T	"	+++		+++		++		

TABLEAU III
Chlorhydrate
d'émétine

	1er jour Ensemencement	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/160.000	-		-			
2	"	+++	1/320.000	-	-	-		X	
3	"	+++	1/640.000	++		-			
4	"	+++	1/1.280.000	++		-	-		X
5	"	+++	1/2.560.000	++		+	+		
6	"	+++	1/5.120.000	++		+			
7	"	+++	1/10.240.000	+++		++			
T	"	+++		+++		++			

TABLEAU IV
Chlorhydrate de
2-déhydroémétine

ESSAI N° 2 (*Tableau II*) :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine.*

RÉSULTATS :

Concentrations minimales léthales en vingt-quatre et quarante-huit heures.

<i>Milieu de culture</i>	<i>Temps</i>	<i>Chlorhydrate d'émétine</i>	<i>Chlorhydrate de 2-déhydroémétine</i>
Balamuth	24 h		1 : 160.000
»	48 h	1 : 1.280.000	1 : 1.280.000

ESSAI N° 3 (*Tableau III*) :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate d'émétine.*

ESSAI N° 4 (*Tableau IV*) :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine.*

RÉSULTATS :

Concentrations minimales léthales en vingt-quatre et quarante-huit heures.

<i>Milieu de culture</i>	<i>Temps</i>	<i>Chlorhydrate d'émétine</i>	<i>Chlorhydrate de 2-déhydroémétine</i>
Pavlova	24 h	1 : 160.000	1 : 320.000
»	48 h	1 : 2.560.000	1 : 1.280.000

CONCLUSIONS :

1° Le chlorhydrate de 2-déhydroémétine et le chlorhydrate d'émétine possèdent un très grand pouvoir amœbicide *in vitro*.

2° L'activité du chlorhydrate de 2-déhydroémétine est au moins équivalente à celle qu'exerce le chlorhydrate d'émétine dans les mêmes conditions. Il semble même que l'activité du chlorhydrate de 2-déhydroémétine s'exerce plus rapidement que dans le cas de l'émétine, ainsi qu'il ressort des comparaisons des concentrations minimales léthales après vingt-quatre heures de contact.

DEUXIEME EXPERIMENTATION

Produits : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine* et *chlorhydrate d'émétine*.

Les deux tableaux qui suivent expriment les résultats de deux autres essais effectués trois mois plus tard, avec les mêmes produits, la même souche et sur le milieu de PAVLOVA.

— *Remarque* : dans cette deuxième expérimentation, nous avons utilisé des concentrations nouvelles, soit une gamme de dilutions plus espacées ; et ce fut en quelque sorte une manière de contrôler les résultats antérieurs.

ESSAI N° 1 (Tableau I) :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate d'émétine*.

ESSAI N° 2 (Tableau II) :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : *souche I.P.*
- Produit : *chlorhydrate de 2-déhydroémétine*.

RÉSULTATS :

<i>Milieu de culture</i>	<i>Temps</i>	<i>Chlorhydrate d'émétine</i>	<i>Chlorhydrate de 2-déhydroémétine</i>
Pavlova	24 h	1 : 100.000	1 : 200.000
»	48 h	1 : 2.000.000	1 : 1.000.000

CONCLUSIONS :

Le chlorhydrate de 2-déhydroémétine exerce son activité plus rapidement que l'émétine ; en vingt-quatre heures, elle est en effet plus active que cette dernière, et ne se montre que légèrement inférieure après quarante-huit heures d'action.

TROISIEME EXPERIMENTATION

Produits : *chlorhydrate d'émétine* et *C.I. 433*.

Ici, une fois de plus, le chlorhydrate d'émétine nous a servi de produit de référence pour l'étude de l'activité amœbicide du C.I. 433.

	1er jour		3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
	Ensemencement	Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	Examen après 48 h.	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/50.000	-		-		-		
2	"	+++	1/100.000	-	-	-		-	X	
3	"	+++	1/200.000	+		-		-		
4	"	+++	1/500.000	++		-		-		
5	"	+++	1/1.000.000	+++		-		-		
6	"	+++	1/2.000.000	+++		-	-	-		X
7	"	+++	1/5.000.000	+++		++		++		
T	"	+++		+++		+++		+++		

TABLEAU I

Chlorhydrate d'émétine

	1er jour		3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
	Ensemencement	Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	Examen après 48 h.	24 h.	48 h.
1	"	+++	1/50.000	-		-		-		
2	"	+++	1/100.000	-		-		-		
3	"	+++	1/200.000	-	-	-		-	X	
4	"	+++	1/500.000	++		-		-		
5	"	+++	1/1.000.000	++		-		-		X
6	"	+++	1/2.000.000	+++		+	-	+		
7	"	+++	1/5.000.000	+++		+++		+++		
T	"	+++		+++		+++		+++		

TABLEAU II

Chlorhydrate de 2-déhydroémétine

ESSAI N° 1 (*Tableau I*) :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chlorhydrate d'émétine*.

ESSAI N° 2 (*Tableau II*) :

- Milieu de culture : BALAMUTH.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : C.I. 433.

RÉSULTATS :

<i>Milieu de culture</i>	<i>Temps</i>	<i>Chlorhydrate d'émétine</i>	<i>C.I.433</i>
Balamuth	24 h	1 : 100.000	1 : 1.000
»	48 h	1 : 1.000.000	1 : 100.000

ESSAI N° 3 (*Tableau I*) :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : *chlorhydrate d'émétine*.

ESSAI N° 4 (*Tableau II*) :

- Milieu de culture : PAVLOVA.
- Souche d'amibes : N.S.
- Produit : C.I. 433.

RÉSULTATS :

<i>Milieu de culture</i>	<i>Temps</i>	<i>Chlorhydrate d'émétine</i>	<i>C.I.433</i>
Pavlova	24 h	1 : 100.000	1 : 1.000
»	48 h	1 : 1.000.000	1 : 100.000

Remarque : les résultats ayant été strictement identiques avec les deux milieux utilisés, nous fournissons seulement deux tableaux pour les exprimer :

- *Tableau I* (essais n°s 1 et 3) : *chlorhydrate d'émétine*.
- *Tableau II* (essais n°s 2 et 4) : C.I. 433.

CONCLUSIONS :

1° Le produit C.I. 433 possède une forte activité amœbicidé *in vitro*. Comparativement au *chlorhydrate d'émétine*, choisi comme substance de référence, le produit n'est que 10 fois moins actif.

1er jour	3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
	Ensemencement	Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	
1	"	+++	1/1.000	-		-		24 h. 48 h.
2	"	+++	1/10.000	-		-		
3	"	+++	1/100.000	-	-	-		X
4	"	+++	1/1.000.000	++		-	-	X
5	"	+++	1/10.000.000	+++		++		
T	"	+++		+++		+++		

TABLEAU I

TABLEAU II

	1er jour		3ème jour		4ème jour		5ème jour		Résultats	
	Ensemencement		Culture	Produit	Examen après 24 h.	Subculture	Examen après 48 h.	Subculture	24 h.	48 h.
1	"	"	+++	1/1.000	-	-	-		X	
2	"	"	+++	1/10.000	+		-			
3	"	"	+++	1/100.000	++		-	-		X
4	"	"	+++	1/1.000.000	+++		++			
5	"	"	+++	1/10.000.000	+++		+++			
T	"	"	+++		+++		+++			

2° Le pouvoir amœbicide du C.I. 433 semble s'exercer plus longtemps que celui du chlorhydrate d'émétine, ainsi qu'il ressort de la comparaison des concentrations minimales léthales après seulement vingt-quatre heures de contact, soit respectivement 1 : 100.000 pour le chlorhydrate d'émétine et 1 : 100 pour le C.I. 433. Le rapport de ces concentrations léthales est ainsi de 1/100^e après vingt-quatre heures, mais il est réduit à seulement 1/10^e après quarante-huit heures.

QUATRIEME EXPERIMENTATION

Produits : *entamide et furoate d'entamide.*

Nous avons effectué une étude comparative des activités *in vitro* de ces produits.

L'expérience a été conduite dans les conditions suivantes :

— Milieu de culture : PAVLOVA.

— Souche d'amibes : *souche I.P.*

RÉSULTATS :

— Entamide : 1 : 1.000.000.

— Furoate d'entamide : 1 : 1.000.000.

CONCLUSION :

L'entamide et le furoate d'entamide possèdent une très forte activité amœbicide *in vitro* ; celle-ci s'est révélée identique pour ces deux produits.

L'EXPERIMENTATION "IN VIVO"

PLAN DU CHAPITRE

I) EXPOSE HISTORIQUE

- a) *Les animaux de laboratoire ;*
- b) *Les méthodes d'inoculation à l'animal ;*
- c) *Les techniques de JONES et de SCHNEIDER et MONTEZIN ;*

II) TRAVAUX PERSONNELS

- a) *« Entamoeba muris »*
 - b) *Le problème d'« Entamoeba muris »; ses solutions ;*
 - c) *Une nouvelle technique d'essai « in vivo » ;*
 - d) *Nos expériences sur la virulence de trois souches d'amibes dysentériques en culture.*
-

AVANT-PROPOS

Dans le chapitre précédent, nous avons vu comment l'essai *in vitro* permet d'éprouver rapidement l'efficacité amœbicide d'un nouveau produit, par sa confrontation directe avec les amibes en cultures.

Un tel essai permet ainsi une rapide sélection parmi de nombreux produits, et c'est là l'intérêt essentiel de son exécution.

Toutefois, la culture ne reproduisant pas intégralement les conditions de vie de l'amibe dans le milieu organique, l'essai *in vitro* ne renseigne qu'en partie sur la valeur pharmacologique d'un nouveau produit. Aussi, avant toute application à l'Homme, pour avoir la confirmation de l'activité amœbicide et obtenir les premières notions thérapeutiques, c'est en dernier ressort à l'expérimentation sur l'animal qu'il convient de s'adresser.

Dans le présent chapitre, nous avons cherché à mettre au point une méthode pratique pour la réalisation du stade *in vivo* de l'épreuve pharmacologique.

Si l'on excepte quelques travaux relatifs à l'amibiase spontanée du Singe (ANDERSON et HANSEN) ou du Hamster doré (DENNIS, BERBERLIAN et HANSEN) la plupart des essais *in vivo* font appel à l'infestation expérimentale d'un animal de laboratoire.

Ici également de nombreux procédés existent et ils utilisent divers animaux.

Pour commencer notre exposé, il nous a donc semblé utile de faire un rappel des principaux travaux déjà effectués sur l'amibiase expérimentale.

Cet exposé historique, nous l'avons divisé en trois parties et nous n'avons pas négligé de lui apporter nos observations personnelles. La première partie est une étude sélective portant sur les animaux de laboratoire ; la deuxième concerne l'infestation de ces animaux et la troisième partie est un rappel des méthodes d'essai de JONES et de SCHNEIDER et MONTEZIN.

Après cette étude préliminaire, nous faisons l'exposé de nos travaux personnels.

Nous proposons une nouvelle méthode d'essai *in vivo* ; elle nous a été inspirée par les résultats de nos propres expériences. Le jeune Rat de laboratoire étant l'animal adopté dans cette méthode, nous abordons simultanément la question d'« *Entamoeba muris* » qui est une difficulté inhérente à l'utilisation de cet animal.

Les difficultés que nous avons rencontrées au cours de nos essais d'infestation expérimentale nous ont montré l'importance du facteur virulence. Nous avons ainsi été amenés à effectuer quelques recherches dans le but d'augmenter la virulence chez trois souches non pathogènes que nous possédions.

L'exposé de ces expériences fait l'objet du dernier paragraphe de ce chapitre.

I. — EXPOSE HISTORIQUE

Première partie

LES ANIMAUX UTILISÉS

Pour la commodité de la présentation, nous avons réuni les travaux effectués sur un même animal et, pour cette raison, ils sont exposés, ici, en brefs historiques séparés.

LE CHIEN

C'est chez le chien qu'en 1875, LOESCH réalise la première amibiase expérimentale. Dans les années suivantes, le même animal est utilisé avec succès par HLAVA (1887), puis par KRUSE et PASQUALE en 1894. Abandonné pendant un temps assez long, le Chien n'est repris qu'en 1934 par FAUST, SCOTT et SWARTZELDER [38] puis par THOMPSON et LILLIGREN en 1949 [92] et ces auteurs mettent au point une technique d'infestation.

Lorsqu'il est soumis à un régime constitué de chair de poisson (saumon en boîte) et additionné d'huile de foie de morue et de levure de bière pour éviter la carence vitaminique, l'animal contracte une maladie de longue durée, non spontanément guérissable, se prêtant aux essais chimiothérapiques (THOMPSON [91] ; CUCKLER et coll. [22]).

Toutefois, le Chien reste un animal peu utilisé. Pour des raisons que l'on conçoit aisément, il est peu convenable pour l'expérimentation courante et se prête mal à des essais en série.

LE CHAT

A la suite des travaux de HLAVA, en 1887, le Chat remplace rapidement le Chien comme animal d'expérience. Les travaux de KOVACS, KRUSE, PASQUALE, MARCHOUX montrent que l'inoculation de selles dysentériques par la voie rectale détermine facilement l'amibiase expérimentale chez cet animal.

En 1893 QUINCKE et ROSS, puis LESAGE en 1903 obtiennent l'infestation du Chat par l'ingestion de formes kystiques.

WERNER, en 1909, démontre que l'amibe dysentérique peut exister sous deux formes « tetragena » et histolytica », de pouvoir pathogène identique pour l'animal. Mais l'administration *per os* de ces formes ne lui donne pas de résultat.

L'année suivante, GARIN, réussit des infestations mortelles chez le Chat et observe la localisation des lésions au niveau du rectum et sur le cæcum principalement.

En 1913, WENYON obtient des lésions à partir d'une forme « tetragena » et même un abcès du foie au quatrième passage. Il fait la constatation importante que le Chat n'élimine jamais de kystes.

C'est en 1914 que BAETJER et SELLARDS essayent un nouveau procédé d'inoculation : l'introduction directe des amibes dans le cæcum, après laparotomie. Mais en raison de complications opératoires, ils sont obligés d'abandonner ce procédé et reprenant la voie rectale, ils obtiennent 100 pour 100 de résultats positifs pendant onze passages successifs.

Par la suite certains auteurs tentent d'obtenir des localisations extra-intestinales, à l'exemple de l'amibiase humaine. Les inoculations vésicales, pulmonaires ou dans l'intestin grêle ne conduisent pourtant qu'à des échecs.

L'inoculation par voie cæcale est reprise par REES en 1931, puis par MELENEY et FRYE en 1932 et finalement par DESCHIENS et PROVOST [31] qui en 1937 fournissent une technique précise applicable au Chat.

De ces expériences, il ressort que le Chat est un animal particulièrement réceptif à l'infection amibienne : l'utilisation du jeune chat surtout permettant d'obtenir près de 100 pour 100 de succès. Cependant, de même que le Chien, le Chat est un animal que l'on se procure difficilement, et bien peu de laboratoires possèdent un élevage de chat.

De plus, la nécessité d'utiliser des animaux jeunes contraint l'expérimentateur à un rythme saisonnier.

Par ailleurs DALE et DOBELL [23], ayant observé que la maladie expérimentale du chaton n'est pas influencée par l'administration de doses élevées d'émétine, on peut se permettre d'avoir quelques doutes sur la valeur des résultats chimiothérapiques que fournirait l'expérimentation chez cet animal.

LE SINGE

MUSGRAVE et MOSES (1907), puis FRANCHINI (1911) réussissent à infester expérimentalement le Singe.

En 1935, HEGNER montre que les Singes inférieurs, inoculés avec des selles humaines, deviennent des porteurs sains, éliminant de nombreux kystes, mais qu'ils ne présentent jamais de lésions intestinales.

LE LAPIN

HUBER utilise le Lapin pour la première fois en 1909 et réussit à l'infester par l'ingestion de kystes d'amibes.

En 1929, HARRIS et FRIEDRICHS échouent en utilisant chez cet animal les voies intraveineuse, intrahépatique et intratesticulaire.

Plus récemment, TOBIE [95] puis LUTTERMOSER et ses collaborateurs [58] mettent au point une technique d'infestation expérimentale. Chez le Lapin de six à douze semaines, qu'ils soumettent à un régime pauvre (avoine, blé, son), ils pratiquent l'inoculation par injection intracæcale. Dans 80 à 90 p. 100 des cas, ils obtiennent ainsi une amibiase aiguë, avec ulcération, diarrhées, amaigrissement, conduisant à la mort de l'animal en une quinzaine de jours.

L'observation montre que l'amibiase expérimentale du Lapin est très voisine de la dysenterie amibienne de l'Homme ; pourtant, le Lapin n'est pas souvent choisi comme animal d'expérience dans les recherches chimiothérapiques.

LE COBAYE

Le Cobaye a fait également l'objet d'études nombreuses. Après quelques tentatives infructueuses de WERNES (1904), BAETJERS et SELLARDS (1914), réussissent l'inoculation expérimentale, chez cet animal, par injection rectale, de selles dysentériques de Chat. Quelques années plus tard, CHATON obtient aussi deux résultats positifs sur six animaux inoculés par ingestion de kystes et par inoculation rectale.

En 1949, CARRERA et FAUST [14], SOHIER et PELOUX [85, 67], puis TAYLOR et ses collaborateurs [89] décrivent l'amibiase expérimentale du Cobaye.

Chez l'animal de 100 à 200 g environ, se développe une maladie grave, souvent mortelle, donnant des lésions ulcératives profondes rappelant celles de l'amibiase intestinale humaine.

Utilisant cette amibiase expérimentale, TAYLOR et GREENBERG [90], et LYNCH [59] pratiquent plusieurs essais chimiothérapiques. Ils évaluent l'effet thérapeutique en observant l'absence des amibes ou leur présence en nombre plus ou moins élevé et l'importance des lésions.

Cependant, bien que le Cobaye soit un animal réceptif, relativement peu coûteux et d'entretien facile au laboratoire, il ne paraît pas être l'animal de choix pour les essais chimiothérapiques, car les amœbicides classiques comme l'émétine, la carbasone ou les dérivés iodés de l'oxy-quinoléine manifestent chez lui une activité inconstante.

LA SOURIS

En 1928, KESSEL tente l'infestation de la Souris ; il n'obtient qu'un résultat positif sur 10 animaux inoculés.

HUEYDA et KITABATAKE, en 1933, opérant sur 100 souris et inoculant par la voie rectale une souche virulente pour le Chat, infestent 70 animaux ; certains de ceux-ci présentent des selles diarrhéiques.

Depuis cette époque, peu de travaux ont fait appel à la Souris, et plus volontiers les expérimentateurs préfèrent utiliser le Rat.

LE RAT

C'est en 1915 que LYNCH met en évidence la sensibilité de cet animal. Il constate que l'ingestion de selles dysentériques détermine chez *Mus norvegicus* une infection intestinale sévère, avec présence d'amibes dans les excréments muqueux. L'autopsie lui révèle une inflammation aiguë de tout l'intestin et des lésions au niveau du cæcum.

En 1919, BRUG observe que la plupart des rats émettent de temps en temps des kystes d'une amibe assez voisine d'*Entamœba coli*. La même constatation est faite par KESSEL qui, pour débarrasser les rats de ces amibes spontanées, les soumet à une purgation préalable. Il réussit des infestations avec *E. histolytica*, mais ne décrit pas les symptômes obtenus.

CHIANG (1925) observe également la présence de ces amibes *Var murinæ* et propose pour leur élimination la pratique de lavements et l'administration de nourriture stérile.

TSUCHIYA, un peu plus tard, inoculant des kystes directement dans l'estomac, n'arrive pas à infester ses rats.

En 1946, reprenant l'utilisation du Rat pour des recherches chimiothérapiques, JONES [47] met au point une technique d'essai mais ne semble pas tenir compte de la cause d'erreur due aux amibes du Rat, déjà signalée par les auteurs précédents.

Aussi, à la suite d'une série d'essais fondés sur les travaux de JONES et dans lesquels ils n'enregistrent que des échecs, SCHNEIDER

et MONTEZIN [77] concluent n'avoir jamais pu réaliser l'infestation du Rat par des amibes dysentériques et n'avoir eu affaire qu'à une infestation spontanée par *Entamoeba muris*. Leur hypothèse est bientôt confirmée par un travail analogue de FULTON et JOYNER [40].

SCHNEIDER et MONTEZIN [78, 79] proposent alors de dépister les animaux porteurs d'*Entamoeba muris* par ponction exploratrice du cæcum et de les éliminer de l'expérience. Par ailleurs, l'utilisation d'une nouvelle souche d'*Entamoeba dysenteriae*, plus virulente, leur permet d'atteindre 90 p. 100 d'infestations expérimentales positives. Ils montrent enfin que le passage de Rat à Rat provoque une exaltation de la virulence des souches. L'infestation du Rat qu'ils décrivent alors correspond à une véritable maladie clinique, avec élimination de matières glaireuses et hémorragiques, ulcérations du cæcum et présence de nombreuses amibes hématophages.

Depuis les travaux de SCHNEIDER et MONTEZIN, il est apparu que le jeune Rat est un animal très convenable pour l'étude de l'amibiase expérimentale. Il est en effet réceptif à la maladie et susceptible, comme on l'a vu, de contracter une véritable affection qui se prête bien aux essais chimiothérapiques [79].

De plus, le Rat est un animal peu coûteux, facile à élever et à entretenir au laboratoire et qui convient très bien pour les essais en séries. Les drogues efficaces chez l'Homme se montrent également actives dans l'amibiase expérimentale du Rat, et ceci vient légitimer l'utilisation de cette infestation comme procédé d'étude des anti-amibiens.

Pour ces raisons, c'est le Rat que nous avons retenu comme animal d'expérience. Dans les paragraphes suivants, nous nous sommes attachés à modifier avec un maximum de simplifications les conditions expérimentales de son utilisation.

LE HAMSTER

Un autre Rongeur, le Hamster doré, est également utilisé pour l'étude expérimentale de l'amibiase.

En 1951, THOMPSON et REINERTSON [93] réussissent l'implantation de l'amibe dysentérique dans le foie de cet animal. Après une laparotomie et par injection directe dans le foie, ils déterminent ainsi une affection localisée, très sévère et rapidement mortelle pour l'animal en absence de traitement.

Ces auteurs ont ensuite décrit une méthode d'essai pour les médicaments utilisables dans les complications extra-intestinales de l'amibiase (NEAL et VINCENT [64, 65], WILLIAMS [96]).

Plus récemment, JARUMILINTA et MAEGRAITH [45] mirent en évidence la réceptivité du Hamster à l'infestation intestinale et notèrent la tendance spontanée de cet animal à fournir des complications hépatiques.

Toutefois, jusqu'à l'heure présente, l'amibiase intestinale du Hamster n'a été que rarement utilisée. Peut-être connaîtra-t-elle un jour une plus grande faveur.

Moins économique que le Rat, le Hamster est néanmoins un animal bien répandu dans les élevages et qui s'entretient facilement. Pour notre part, dans le but d'étudier la virulence de nos souches, nous avons pratiqué avec succès de nombreuses inoculations dans le foie de cet animal. Nous l'avons également utilisé pour des recherches chimiothérapiques, fondées sur son parasitisme spontané par une amibe voisine, sinon identique, à celle du Rat : *Entamoeba criceti*. L'exposé de ces travaux fera l'objet de nos prochains chapitres.

Deuxième partie

LES MÉTHODES D'INOCULATION A L'ANIMAL

Comme nous venons de le voir, le laboratoire dispose d'une grande variété d'animaux susceptibles d'être utilisés pour la réalisation de l'amibiase expérimentale.

Cependant, en dehors du choix de l'animal, qui peut être plus ou moins convenable pour les essais en séries, il existe un deuxième point qu'il faut préciser dans la méthode d'essai *in vitro*. C'est le choix de la technique d'inoculation du matériel virulent chez l'animal.

Ainsi que nous l'avons fait à propos des animaux de laboratoire, il nous paraît également logique ici, afin de justifier notre préférence, de passer rapidement en revue les principales possibilités offertes pour l'infestation expérimentale.

Trois techniques d'inoculation sont généralement utilisées : nous les rappelons ici brièvement.

• *Inoculation par la voie rectale*

L'inoculation des amibes par la voie rectale a été le premier procédé d'infestation imaginé par les auteurs. Déjà en 1887, en effet, chez le Chien puis chez le Chat, HLAVA réalisait les premières infections par injection rectale de selles dysentériques.

Par la suite, de nombreux auteurs (KOVACKS, KRUSE, PASQUALE, vers 1890 ; GARIN, 1910 ; BAETJERS et SELLARDS, en 1914) reprennent

ce procédé et il ressort de toutes leurs expériences que celui-ci est efficace et qu'il permet d'obtenir généralement un pourcentage très élevé de résultats positifs.

En 1924, la découverte de BOECK et DRBOHLAV vient faciliter ce procédé en rendant possible l'utilisation, plus commode sinon plus efficace, des amibes de culture comme matériel d'inoculation. De plus, ces mêmes auteurs, insistant sur l'importance de la stase intestinale comme facteur favorisant l'infestation, préconisent l'obturation de l'anus pendant quarante-huit heures par du coton collodionné.

Plus récemment, enfin, en 1936, BRUMPT [12] décrit une technique complète dans laquelle il précise les différents gestes de l'inoculation rectale chez le Chat.

La technique d'inoculation par la voie rectale est certes efficace ; elle présente néanmoins l'inconvénient d'être d'une mise en œuvre assez délicate et de nécessiter un matériel particulier pour l'intubation. Par ailleurs, c'est une technique qui n'apparaît commodément utilisable que pour l'infestation d'animaux de taille importante, comme le Chat, le Lapin, le Chien. En ce qui concerne le Rat, qui est l'animal d'expérience que nous avons choisi, du fait de sa petite taille et surtout à cause de l'inévitable répétition de nos infestations en série, l'inoculation par la voie rectale nous paraît être une opération peu convenable.

• *Ingestion de trophozoïtes ou de kystes*

L'infestation des animaux par ingestion de kystes d'amibes (et même d'amibes végétatives) est certes un procédé séduisant, et les auteurs y ont pensé depuis longtemps.

Si l'administration par voie buccale des formes végétatives n'a conduit qu'à des échecs (WERNER, 1909), en revanche l'ingestion de formes kystiques est habituellement couronnée de succès.

Dès 1893, QUINCKE et ROSS réussissent à infester le Chat en utilisant ce procédé.

Utilisant la même voie, LESAGE obtient en 1907 plusieurs résultats positifs sur le même animal.

HUBER, en 1909, infecte 4 lapins sur 8 ; et LYNCH, en 1915, réalise chez le Rat la première infestation par ingestion de selles dysentériques.

Tous ces résultats montrent que, dans une certaine mesure, l'inoculation orale des kystes peut être efficace. Cependant cette voie d'infestation ne satisfait pas entièrement aux exigences de l'expérimentation en série. En effet, en plus de la délicate préparation de

l'inoculum riche en kystes (la récolte des kystes se faisant à partir de selles dysentériques ou de cultures orientées vers l'enkystement), ce procédé n'offre pas à l'heure actuelle la garantie d'une infestation rapide, régulière et sûre, qualités nécessaires aux essais *in vivo*.

• *Inoculation intra-cæcale après laparotomie*

C'est en 1914, avec BAETJERS et SELLARDS [3, 4], que nous voyons apparaître ce nouveau procédé d'inoculation ; les auteurs l'utilisent, en effet, dans leurs premières tentatives d'infestation chez le Chat. Malheureusement, ils sont conduits à l'abandonner en raison des complications péritonéales post-opératoires.

Bien plus tard seulement, le procédé est repris par REES (1931), puis par MELENEY et FRYE (1932), et enfin par DESCHIENS et PROVOST [31] qui, en 1937, décrivent une technique précise qui comprend les temps suivants :

- soumettre l'animal à la diète hydrique pendant vingt-quatre heures avant l'intervention ; l'anesthésier à l'éther, puis pratiquer sur le ventre une laparotomie avec incision de 4 cm environ ;
- rechercher le rectum et en extérioriser l'angle iléo-cæcal ;
- inoculer au niveau de cet angle et vers le cæcum 1 ml d'une culture d'amibes de trois jours. Aussitôt l'aiguille retirée, toucher le point d'inoculation avec un coton imbibé d'éther ;
- suturer au catgut et poser des agrafes sur la peau.

L'opération terminée, mettre l'animal à la diète lactéc pendant quarante-huit heures.

En 1946, JONES [47] utilise la même voie d'inoculation chez le Rat. Les résultats qu'il obtient sont très satisfaisants, les animaux supportent aisément l'opération.

Par la suite, de nombreuses expériences analogues viennent confirmer l'efficacité de l'inoculation par la voie intra-cæcale. Ce sont en particulier les expériences de GOODWIN, HOARE, SHARP [42] sur le Rat, puis celles de SCHNEIDER et MONTEZIN [78, 79, 80] pratiquées à grande échelle sur ce même animal (1948), et aussi celles de SOHIER et PELOUX [85, 67] sur le Cobaye (1949).

Nous avons éprouvé ce procédé et effectué plusieurs infestations chez le Rat.

En effet, ayant disposé à un moment de nos travaux d'une souche virulente d'amibes, nous avons infesté une quarantaine de jeunes rats âgés de trois à quatre semaines, et réalisé ainsi 15 passages successifs sur cet animal.

La technique d'infestation que nous avons utilisée a été inspirée de celle de JONES, et elle comprend les temps suivants :

- soumettre l'animal à la diète hydrique pendant vingt-quatre heures avant l'intervention ;
- sous anesthésie à l'éther, pratiquer sur la partie droite du bas-ventre (animal faisant face) une laparotomie avec incision de 1,5 cm ; extérioriser le cæcum ;
- inoculer dans le cæcum, en direction du cul-de-sac, 0,5 ml d'une culture riche et récente ou d'une suspension d'amibes préparée avec de l'eau physiologique à partir du produit de raclage d'un cæcum infesté ;
- suturer les parois avec du simple fil à coudre.

L'opération terminée, remettre l'animal au régime normal six heures après. (La mortalité opératoire est de l'ordre de 10 pour 100.)

Pratiquées de cette manière, les infestations de cæcum à cæcum furent positives dans tous les cas. Chez la plupart des animaux infestés et non sacrifiés, l'affection fut mortelle en huit à dix jours.

NATURE DE L'AFFECTION

Les animaux infestés accusent un net amaigrissement, présentent des selles diarrhéiques dès le quatrième ou le cinquième jour, et laissent observer à l'autopsie une muqueuse cæcale hémorragique, parsemée de lésions ulcératives blanchâtres, et de très nombreuses amibes hématophages dans le produit de raclage des lésions et dans l'intérieur du cæcum.

L'inoculation intracæcale après laparotomie est ainsi le procédé qui nous a semblé le plus commode pour l'infestation du Rat. C'est lui que nous avons utilisé dans nos expériences.

Troisième partie

LES MÉTHODES D'ESSAI DE JONES ET DE SCHNEIDER ET MONTEZIN

L'étude précédente nous a conduit à préférer l'amibiase expérimentale du Rat et la technique d'inoculation par la voie intracæcale après laparotomie comme procédés convenant le mieux aux essais chimiothérapiques en série.

Une telle conclusion n'est d'ailleurs pas nouvelle, elle est partagée par d'autres auteurs et c'est ainsi qu'avec elle nous aboutissons à

deux techniques d'essais déjà bien connues. Il s'agit, d'une part de celle de JONES [47] présentée en 1946 et qui fut illustrée par de nombreux essais de l'auteur ; puis, d'autre part, celle de SCHNEIDER et MONTEZIN [79], technique inspirée de la précédente, mais consciente de ses imperfections et soucieuse d'y remédier.

Ces deux techniques nous ont servi de point de départ dans nos expériences sur l'infestation du Rat. Pour cette raison, nous exposons rapidement ici les détails de leur mise en œuvre.

LA TECHNIQUE DE JONES (1946)

En 1946, JONES montre qu'il est possible de parasiter le Rat avec *E. dysenteriae*, et il décrit la technique d'essai suivante :

- utiliser des rats récemment sevrés, et pesant de 20 à 30 g. Après une laparotomie sous anesthésie, injecter dans le cæcum des rats 20.000 à 100.000 trophozoïtes en suspension dans 0,25 ml de solution de mucine gastrique à 5 pour 100.

Dans ces conditions, 80 à 85 pour 100 des animaux présentent au bout de quelques jours une amibiase expérimentale sans symptômes cliniques et décelables par l'examen microscopique du mucus cæcal.

Tous les rats sont sacrifiés le sixième jour et l'on compare l'état d'infestation du cæcum des animaux traités à celui des animaux témoins.

LA TECHNIQUE DE SCHNEIDER ET MONTEZIN (1951)

A la suite de plusieurs expériences négatives effectuées selon la technique de JONES, SCHNEIDER et MONTEZIN adoptent une nouvelle méthode dont le protocole est défini par les deux conditions suivantes :

- 1) Emploi d'animaux jeunes de trois à quatre semaines, car ils sont moins fréquemment infestés par *E. muris* et dépistage par ponction exploratrice du cæcum de ceux qui le sont spontanément.
- 2) Utilisation pour l'infestation d'une souche bien virulente, et exaltation de la virulence par passages successifs dans le cæcum du Rat.

Opérant dans ces conditions, les auteurs obtiennent près de 100 pour 100 d'infestations positives, et décrivent leur technique d'essai.

Technique :

Utiliser des rats de trois ou quatre semaines récemment sevrés que l'on anesthésie à l'éther.

Après une laparotomie et une ponction exploratrice du cæcum dans le but d'éliminer les animaux éventuellement porteurs d'*E. muris*, pratiquer une injection intracæcale de 0,3 à 0,5 ml d'une culture riche d'*E. dysenteriae* entretenue sur milieu N de l'I.P.

Séparer les animaux en deux lots égaux : l'un servant de témoin de l'infestation, l'autre utilisé pour l'essai du médicament. Le produit à essayer est alors administré en doses journalières, par voie buccale ou parentérale dès le deuxième jour de l'infestation et pendant quatre jours consécutifs.

Trois jours après la fin du traitement, soit le huitième jour de l'expérience, sacrifier tous les animaux, les autopsier et pratiquer des examens du mucus cæcal. Juger de l'efficacité du médicament en comparant, grâce à une notation conventionnelle, la densité des amibes chez les animaux témoins à celle observée chez les animaux soumis à la thérapeutique.

L'évaluation du degré d'infestation se fait de la manière suivante :

+++	plus de 10 amibes par champ (gros. : 470 X)
++	de 3 à 9 amibes par champ
+	de 2 amibes par champ à 1 par 10 champs
(+)	1 amibe pour 10-50 champs
0	aucune amibe dans 50 champs

Les résultats obtenus sont exprimés en doses quotidiennes curatives (mg/kg).

II. — TRAVAUX PERSONNELS

L'amibiase expérimentale du jeune Rat, obtenue par l'inoculation intra-cæcale après laparotomie, étant le procédé pharmacologique choisi pour notre étude, nous avons, dès le départ, effectué nos expériences d'infestations selon les méthodes de JONES et de SCHNEIDER et MONTEZIN précédemment décrites. Nous nous proposons ainsi d'éprouver ces méthodes et de nous livrer éventuellement à quelques essais thérapeutiques.

Très tôt pourtant, nous nous sommes heurtés aux difficultés d'une telle expérimentation, et nos essais nous soulignèrent nettement l'importance de deux points essentiels. Ce sont, d'une part, la présence spontanée d'« *Entamœba muris* » chez le Rat, et d'autre part, l'absence de virulence chez la majorité des souches d'« *Entamœba dysenteriae* » dont nous disposions.

Certes, d'autres auteurs ont déjà signalé ces faits, et en particulier SCHNEIDER et MONTEZIN ; toutefois, il nous a semblé indispensable de les rappeler et de les étudier une nouvelle fois, car la difficulté qu'ils opposent est permanente, et constitue une réelle entrave à la réalisation de l'essai pharmacologique « *in vivo* ».

Pour cette raison, nos expériences « *in vivo* » eurent essentiellement pour but l'étude de ces deux problèmes.

Dans le présent paragraphe, nous aborderons d'abord la question d'« *Entamœba muris* ». Nous envisageons ses principales solutions, et, au terme de cette étude, nous proposons une technique personnelle d'essai « *in vivo* ».

Dans le paragraphe suivant, nous exposons quelques tentatives effectuées dans le but d'augmenter la virulence des souches d'amibes dysentériques de culture.

A) *Entamoeba muris*

La découverte d'« *Entamoeba muris* » remonte déjà à fort longtemps. GRASSI l'observe pour la première fois en 1874, et il est aussi le premier à en donner la description.

Bien plus tard, en 1907, WENYON décrit à nouveau cette espèce. Mais jusqu'alors « *Entamoeba muris* » n'a d'autre importance que celle d'être un hôte banal et inoffensif de l'intestin du Rat.

Pourtant, avec les premières tentatives d'infestation du Rat par « *Entamoeba dysenteriae* », nous voyons « *Entamoeba muris* » gagner quelque considération. A quelques auteurs, en effet, ce saprozoïte apparaît comme hôte indésirable et susceptible d'interférer avec l'infestation par l'amibe parasite. Dès 1923, KESSEL cherche alors à l'éliminer. Dans ce but il soumet le Rat à une purgation. CHIANG aussi, vers 1925, observant la présence fréquente de cette amibe qu'il intitule « var *murinae* », difficilement différenciable d'« *Entamoeba dysenteriae* », essaie de l'éliminer par des lavements et en administrant à ses animaux une nourriture stérile.

En 1946, les nombreuses expériences de JONES sur le Rat redonnent de l'intérêt à l'étude expérimentale chez cet animal. Cependant, dans l'exposé de sa technique, JONES, ainsi que nous l'avons vu, ne tient pas compte d'« *Entamoeba muris* ». La technique apparaît ainsi imparfaite à plusieurs auteurs, en particulier SCHNEIDER et MONTEZIN, FULTON et JOYNER, NÉAL qui soulignent alors l'importance d'« *Entamoeba muris* », et mettent en relief la non négligeable cause d'erreur qu'il constitue, lors de l'infestation du Rat par « *Entamoeba dysenteriae* ».

MORPHOLOGIE

Les premières descriptions d'« *Entamoeba muris* » fournies par GRASSI (1881) WENYON (1907) puis FULTON et JOYNER (1948) étaient incomplètes et ce n'est qu'en 1949 que NÉAL [62] apporte le complément de précisions morphologiques nécessaires.

LE TROPHOZOITE

« *Entamoeba muris* » mesure 10 à 30 μ de diamètre et se meut en produisant des pseudopodes ectoplasmiques bien nets et vifs. Chez cette amibe, l'endoplasme et l'ectoplasme sont nettement différenciés.

Les vacuoles renferment des bactéries, des débris intestinaux ou d'autres protozoaires. Observé après coloration à l'hématoxyline ferrique, le noyau offre l'aspect d'une vésicule, et laisse voir une couche de granules périphériques égaux, uniformément répartis sur toute la surface et un caryosome nettement excentrique.

LE KYSTE

Les kystes formés dans le cæcum sont expulsés avec les matières fécales. Les kystes non mûrs renferment généralement une grosse vacuole à glycogène. A maturité, ils présentent huit noyaux et mesurent de 13 à 18 μ de diamètre. Les formations chromatiniennes sont rarement présentées dans les kystes mûrs, mais quand elles s'y trouvent, elles ont habituellement l'allure de bâtonnets aux extrémités irrégulières. La structure du noyau du kyste est analogue à celle du noyau de l'amibe adulte.

Morphologiquement « *Entamœba muris* » est donc identique à « *Entamœba coli* » de l'Homme. Elle se distingue de l'amibe dysentérique par deux points principaux : la position excentrique du caryosome dans le noyau, et le fait que les kystes mûrs renferment huit noyaux.

L'amibe trouvée quelquefois chez la Souris est identique à celle du Rat, et la majorité des auteurs l'identifie à « *Entamœba muris* ».

Quant à l'amibe spontanée du Hamster doré, dénommée « *Entamœba criceti* » et au sujet de laquelle tous les auteurs ne semblent pas s'accorder, elle est identique à « *Entamœba muris* » ou constitue une espèce très voisine.

CULTURE

Les premières tentatives de culture d'« *Entamœba muris* » remontent aux travaux de GRASSI, en 1882. Peu de temps après la découverte de cette amibe l'auteur essaie de la cultiver mais n'y parvient pas.

Des nombreux essais effectués par la suite, il ressort qu'« *Entamœba muris* » s'adapte très difficilement en culture. Toutes les méthodes de culture présentées s'avèrent, en effet, insatisfaisantes et non reproductibles.

Ainsi, en 1931, KUWABARA [51] prétend avoir réussi la culture d'« *Entamœba muris* » : l'amibe cultivée vient d'un Rat de laboratoire,

et le milieu de culture est celui de Tanabe et Chiba. L'auteur conserve ces cultures pendant 121 jours et 50 générations.

FRYE et MELENEY [39] en 1932, cultivent aussi l'amibe d'un Rat sauvage.

Cependant, en 1949, NÉAL [62] ne peut réussir aucune culture d'« *Entamœba muris* » sur plusieurs milieux essayés et en particulier sur celui de DOBELL et LAIDLAW.

L'année suivante SIMITCH et PETROVITCH [83] disent avoir obtenu une culture d'« *Entamœba muris* » à partir de Souris blanches. Ils la conservent un mois sur un milieu diphasique à base de gélose salée et à la température de 22-23°C.

En 1953, FULTON et ses collaborateurs, puis MUDROW-REICHENOW [61] en 1956 ne peuvent conserver « *Entamœba muris* » au delà de quatre repiquages, sur le milieu de Dobell et Laidlaw à la température de 37-38°C.

Finalement en 1959, PRUSS [69] reprenant les travaux sur la culture d'« *Entamœba muris* », n'obtient que des résultats discordants ou négatifs avec les précédentes méthodes. Poursuivant ses expériences, il parvient toutefois à la mise au point d'un nouveau milieu qui lui permet d'obtenir facilement la culture d'« *Entamœba muris* ».

Le milieu de PRUSS a la composition suivante :

- phase solide : sérum de cheval coagulé ;
- phase liquide : liquide albuminé, auquel on ajoute de l'amidon de riz et une faible quantité de pénicilline.

La température de culture est 37°C et les repiquages s'effectuent tous les deux jours.

Pour notre part, nous avons limité nos expériences à des essais de culture d'*E. muris* sur les milieux que nous avons utilisés pour la culture d'*Entamœba dysenteriae* ; c'est-à-dire le milieu diphasique de l'I.P. et les deux milieux liquides de BALAMUTH et de PAVLOVA.

Nos essais de culture ont porté sur l'amibe du Rat de laboratoire (*E. muris*) et sur celle du Hamster doré (*E. criceti*). Ils furent toujours négatifs aux températures étudiées : 18°, 22-23°, 37°C. Les amibes disparaissent des milieux avant même le premier repiquage.

Nous verrons plus loin que ce résultat nettement négatif nous a servi à distinguer *E. muris* d'*E. dysenteriae*.

B) Le problème d' "*Entamæba muris*"

SES SOLUTIONS

Etant donné ce que nous venons de dire concernant *E. muris*, il importe donc toujours de tenir compte de la présence éventuelle de cette amibe lors de l'infestation du Rat avec *Entamæba dysenterix*. L'on comprend facilement en effet que cette amibe, morphologiquement voisine de l'amibe pathogène et spontanément présente chez le Rat, peut être une réelle cause d'erreur si sa présence est négligée.

Nous avons essayé de résoudre ce problème et l'avons défini de la façon suivante :

Comment éviter qu'*E. muris* n'interfère dans l'infestation du Rat par *E. dysenterix* et ne soit ainsi une cause d'erreur ?

1° Faut-il nécessairement en effectuer l'élimination avant l'essai ?

2° Peut-on, si possible, en accepter la présence et n'en tenir compte qu'au moment de l'interprétation des résultats ?

Dans le paragraphe suivant, nous envisagerons les principales solutions déjà préconisées et nous concluons en présentant notre point de vue personnel et une nouvelle technique d'essai.

I. — ÉLIMINATION D'*ENTAMCEBA MURIS* AVANT L'ESSAI

Deux comportements différents peuvent prétendre aboutir à un tel résultat :

1° L'élimination du saprozoïte des animaux porteurs, avant leur utilisation.

2° Le dépistage des animaux porteurs et l'utilisation exclusive de ceux qui ne sont pas infestés.

Les deux procédés ont été utilisés par les chercheurs.

ÉLIMINATION D' "*E. MURIS*" DE L'INTESTIN DU RAT

Vers 1923, KESSEL [49], le premier, a essayé de débarrasser les rats de leurs amibes. Nous avons vu que, dans ce but, il les soumettait à une purgation pure et simple quarante-huit heures avant

l'inoculation : de fréquents examens de selles lui servaient de contrôle. Toutefois, les expériences de KESSEL n'ont porté que sur un nombre restreint d'animaux et, de toute façon, il ne semble pas que l'auteur ait obtenu entière satisfaction.

En 1925, CHIANG [20] également a tenté d'éliminer *E. muris* par des lavements suivis d'examen de contrôle des selles et par l'administration aux animaux d'une nourriture stérile. Ce procédé est malheureusement peu pratique. Il oblige, en effet, à une vaste opération de stérilisation de la nourriture et des litières, et en définitive, il n'offre que bien peu de garanties.

Nous avons fait nous-mêmes quelques tentatives dans le même but. Elles ont consisté essentiellement en l'administration de purgatifs, d'amœbicides (Bémarsal, Vioforme), et aussi en l'action du jeûne sur les animaux : les résultats ne furent pas satisfaisants. De toute façon, le risque de la recontamination, difficilement évitable, nous enlevait l'assurance d'obtenir des résultats durables.

DEPISTAGE ET ELIMINATION DES ANIMAUX PORTEURS D' "*E. MURIS* "

C'est la solution préconisée par SCHNEIDER et MONTEZIN [78] dans leur technique d'essai. Les auteurs insistent, en effet, sur les deux points suivants :

- a) L'utilisation des animaux très jeunes, aussitôt après le sevrage.
- b) L'examen systématique du contenu cœcal, prélevé par ponction directe après laparotomie, de manière à repérer les animaux infestés et à les éliminer.

En effet, si l'amibiase spontanée atteint un pourcentage élevé des rats de trois ou quatre semaines pesant de 25 à 35 g, 65 p. 100 selon FULTON et JOYNER, 56 p. 100 selon SCHNEIDER et MONTEZIN, ces derniers observent cependant qu'elle est beaucoup plus rare chez l'animal plus jeune, récemment sevré et qui n'a pas encore ingéré de nourriture solide.

Pour notre part, des observations effectuées sur des rats de trois à quatre semaines, reçus de trois élevages différents, nous ont malheureusement révélé un pourcentage très élevé d'infestation spontanée : pratiquement voisin de 100 p. 100. Nous n'entretenions pas, il est vrai, de litière et d'alimentation stérilisées. De toute façon, au stade où nous recevions nos animaux, c'eût été peine perdue.

Dans ces conditions, nous livrer à l'élimination des animaux porteurs d'*E. muris* eût été une solution inacceptable. Nous avons envisagé alors la possibilité de ne pas éliminer *E. muris*.

II. — NON ÉLIMINATION D'*ENTAMOEBA MURIS* AVANT L'ESSAI

Devant la difficulté de parvenir à nous débarrasser d'*E. muris*, nous avons envisagé d'adopter une autre solution, c'est-à-dire celle qui permettrait de conduire l'essai sans se soucier de la présence d'*E. muris*, du moins jusqu'au moment de l'interprétation des résultats.

Il nous a semblé qu'une telle attitude se légitimerait, à la condition de pouvoir adopter, dans une nouvelle technique d'essai et pour l'évaluation du degré de l'infestation par *E. dysenteriae*, une échelle dont les différents degrés ne correspondent en aucun cas à des allures quelconques de l'infestation par *E. muris*.

Nous avons pensé qu'il suffirait, pour établir conventionnellement une telle distinction, de pouvoir constater que, chez le Rat, l'infestation par *E. dysenteriae* présente des allures nettement différenciées de celles que l'on observe chez le même animal lorsqu'il est seulement parasité par *E. muris*.

Nous avons ainsi essayé, dans le paragraphe suivant, de souligner la distinction entre ces deux infestations, en remarquant :

- a) Qu'*E. muris* n'est qu'un saprozoïte nullement pathogène pour le Rat.
- b) Qu'une souche virulente d'*E. dysenteriae* détermine chez cet animal une véritable maladie dont les manifestations cliniques sont bien visibles.

PARASITOSE DU RAT DUE A "*E. MURIS*"

Jusqu'ici, nulle part dans la bibliographie nous n'avons relevé de descriptions de symptômes quelconques provoqués par *E. muris*.

Nous avons personnellement observé le cæcum de plusieurs dizaines de rats âgés de trois ou quatre semaines, et presque tous infestés par *E. muris* ; tous présentaient un cæcum absolument normal.

Nous avons même soumis certains de ces animaux à des traitements spéciaux (action du jeûne, du cholestérol, de purgatifs) dans le but de mettre en évidence une éventuelle agressivité d'*E. muris* ; pas une seule fois nous n'avons obtenu d'ulcérations ou d'inflammations du cæcum ; la parasitose ne s'est manifestée que par la présence plus ou moins abondante d'*E. muris*.

A l'heure actuelle, il semble donc que l'on peut tenir pour certain qu'*E. muris* n'est qu'un saprozoïte inoffensif de l'intestin du Rat et qu'il ne provoque pas d'inflammation ou d'ulcération de la muqueuse cæcale.

• *Culture*

Quant aux cultures que nous avons essayées d'obtenir à partir de prélèvements faits sur des cæcums très parasités avec *E. muris*, elles furent régulièrement négatives sur les trois milieux que nous avons étudiés (milieu N de l'I.P. et les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA).

Les amibes disparaissent des milieux au bout de deux à trois jours.

AMIBIASE EXPERIMENTALE DU RAT OBTENUE AVEC "*E. DYSENTERIÆ*"

Dans ce paragraphe, nous n'insisterons pas sur les questions corrélatives, à savoir la technique d'infestation ou la virulence des souches. Nous avons réservé ailleurs, dans ce travail, des exposés concernant ces questions. Ici, nous ne voulons insister que sur l'allure pathologique, sur l'affection que présente le Rat lorsqu'il est infesté par *E. dysenteriae*. Cette affection a déjà été décrite par plusieurs auteurs ; nous l'avons nous-mêmes observée sur de nombreux animaux infestés.

• *Evolution de l'affection*

Les rats infestés avec une souche virulente maigrissent, éliminent des selles glaireuses et diarrhéiques, et la mort survient généralement au bout de huit à dix jours.

A l'autopsie, pratiquée vers le huitième jour, il est facile d'observer au niveau d'un cæcum qui est toujours congestionné, de nombreuses lésions macroscopiques : ulcérations plus ou moins étendues, arrondies et blanchâtres, suffusions hémorragiques. Les lésions quelquefois déjà visibles de l'extérieur du cæcum, s'observent surtout sur la face interne de la muqueuse cæcale.

L'examen microscopique du contenu cæcal muqueux ou du produit de raclage de la muqueuse ulcérée met en évidence une quantité considérable d'amibes dysentériques hématophages.

• *Culture*

Les cultures pratiquées à partir de frottis du cæcum sont toujours positives sur la plupart des milieux de culture d'*Entamœba dysenteriae* et en particulier sur les trois milieux que nous avons étudiés.

— *Remarque* : en dépit de l'expérimentation malheureusement peu importante que nous avons effectuée, nous pensons que l'on doit considérer un tel ensemble de symptômes comme l'allure normale de l'infection dysentérique chez le Rat. En effet, ainsi que nous l'avons conclu au terme d'une étude sur la virulence des souches d'amibes dysentériques, la condition essentielle du succès de l'infestation chez le Rat réside uniquement dans l'utilisation d'une souche d'amibes virulentes.

Nous voulons dire par là qu'il existe certainement des souches incapables d'infester le cæcum du Rat, et d'autres souches capables d'infester cet animal. Avec les premières, toutes les tentatives d'infestation demeurent vaines. Avec les secondes, l'on peut obtenir l'infestation du Rat. Cette infestation se manifeste alors d'emblée chez l'animal par les symptômes précédemment décrits ; toutefois, dans la majorité des cas, il s'avère nécessaire d'exalter ou de reconstituer la virulence de ces dernières souches au moyen de traitements spéciaux (passages successifs sur l'animal, dans le foie du Hamster...) dont nous étudierons quelques-uns dans le paragraphe suivant.

La condition indispensable à la réalisation de l'essai pharmacologique *in vivo* chez le Rat est ainsi de disposer d'une souche d'amibes virulentes pour cet animal : ceci n'est pas toujours facile dans les régions tempérées.

C) Une nouvelle technique d'essai

Compte tenu de ce que nous venons de dire, il nous a semblé tout à fait possible d'adopter, comme procédé de lecture des résultats dans une nouvelle méthode d'essai, une nouvelle échelle de symptômes qui, tout en dépassant les signes de la parasitose due à *E. muris*, reste dans les limites normales de l'infestation par *E. dysenteriae*, permettant ainsi d'apprécier la gravité de cette infestation sans risque d'erreur possible.

La technique d'essai que nous proposons est voisine des précédentes techniques de JONES et de SCHNEIDER et MONTEZIN. Elle diffère de la première par la manière d'interpréter les résultats et, de la seconde, par le fait que les animaux porteurs d'*E. muris* ne sont pas écartés de l'essai.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Utiliser des rats de trois ou quatre semaines que l'on soumet à la diète hydrique vingt-quatre heures avant le début de l'essai.

Sous anesthésie à l'éther, après laparotomie, pratiquer une injection intra-cæcale de 0,5 ml d'une culture riche d'*E. dysenteriae* ou d'une suspension d'un broyat de cæcum infesté.

Séparer les animaux en deux lots égaux : l'un servant de témoins de l'infestation, l'autre utilisé pour l'essai du médicament. Le produit à essayer est alors administré en doses journalières par voie buccale ou parentérale dès le lendemain de l'infestation et pendant quatre jours consécutifs.

Le huitième jour de l'expérience, sacrifier tous les animaux, les autopsier et examiner le cæcum. On évalue l'efficacité du médicament en comparant, grâce à la notation conventionnelle suivante, la gravité de l'infestation chez les animaux témoins à celle observée chez les animaux soumis à la thérapeutique.

GRADUATION DES SYMPTOMES

- 0 aucune amibe dans 50 champs (objectif Zeiss 10/0,25 — oculaire Zeiss 8 ×) ou présence plus ou moins abondante d'amibes dans un cæcum normal et *épreuve de culture négative*.
- (+) nombreuses amibes ; pas d'inflammation du cæcum. *Culture positive*.
- + nombreuses amibes : inflammation du cæcum. *Culture positive*.
- ++ nombreuses amibes ; inflammation ; petites ulcérations. *Culture positive*.
- +++ très nombreuses amibes ; congestion intense ; ulcérations étendues. *Culture positive*.

DISCUSSION

Nous voyons que le degré 0 correspond à une infestation négative. Les amibes éventuellement présentes appartiennent à l'espèce *E. muris* non pathogène et non cultivable sur les trois milieux proposés : milieu N de l'I.P., milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA. On sait que la présence d'*E. dysenteriae* se traduirait par la positivité des cultures faites avec le contenu cæcal des animaux infestés.

Le degré (+) est pratiquement le seul stade d'infestation positive par *E. dysenteriae* avec lequel peut interférer la parasitose due à *E. muris*. Mais l'épreuve de culture fait rapidement la décision :

- culture positive : faible infestation par *E. dysenteriae* [degré (+)] ;
- culture négative : infestation négative (degré 0).

Au degré + : l'inflammation du cæcum donne déjà l'assurance d'une atteinte par *E. dysenteriae*. Toutefois, comme précédemment, l'épreuve de culture permet la confirmation. Ce degré correspond à une infestation moyenne.

Les degrés ++ et +++ sont ceux d'une forte infestation par *E. dysenteriae* et leur allure en est suffisamment expressive. L'épreuve de culture peut néanmoins en porter confirmation.

— *Remarque* : dans nos dernières expériences chez le Rat, nous avons chaque fois utilisé cette technique d'infestation et de contrôle des résultats. Ces expériences nous ont donc permis d'éprouver cette nouvelle manière d'opérer.

Ainsi, dans les infestations effectuées avec des souches que nous avons considérées comme avirulentes, nous n'avons jamais dépassé le degré 0 ; tout au plus, nous avons observé, dans quelques rares cas, la présence de mucus dans le cæcum, apparu certainement à la suite de l'action microbienne de la flore introduite au moment de l'inoculation des amibes.

Par contre, avec une souche virulente, nous avons également pratiqué de nombreuses infestations, aussi bien de cæcum à cæcum qu'avec de récentes cultures (deux ou trois générations), et toujours les divers degrés d'infestation obtenus eurent pour expression les degrés + et ++, +++ surtout.

D) Virulence des amibes de culture

Dans le paragraphe précédent, nous avons essayé de trouver une solution commode au problème d'*E. muris*. En définitive, notre opinion est que ce saprozoïte ne constitue qu'un inconvénient mineur auquel il est relativement facile de remédier.

En revanche, il est un deuxième point important de l'expérimentation *in vivo* ; en fait, c'en est la condition primordiale, car il s'agit de l'infestation de l'animal, faculté qui dépend directement de la virulence de la souche utilisée.

Or si nos expériences nous ont confirmé que le Rat est un animal très sensible à la maladie amibienne, elles nous ont également montré qu'il existe pratiquement bien peu de souches qui permettent de la lui conférer.

En particulier, nous avons constaté que la plupart des souches dont on peut disposer au laboratoire ne permettent pas d'infester l'animal. Cela, on le conçoit facilement, est un inconvénient sérieux qui limite beaucoup l'expérimentation *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris quelques recherches pour essayer d'apporter une solution pratique à ce délicat problème.

Nos expériences ont essentiellement porté sur quatre souches d'amibes dysentériques dont l'une se révéla virulente et les trois autres non virulentes pour le Rat.

Avec la souche virulente, nous avons pu facilement infester le Rat, confirmant ainsi la sensibilité de cet animal. A la suite de nos expériences, nous avons conçu la nouvelle technique d'essai que nous avons proposée.

Avec les trois souches non virulentes, nous avons essayé d'obtenir des infestations positives chez le même animal. Ces expériences font l'objet du paragraphe suivant.

Par ces expériences, nous avons cherché à savoir si l'avirulence était une condition définitive et inhérente à chacune de ces souches, ou si au contraire, et en conséquence d'une culture prolongée, cette avirulence ne correspondait pas à une éclipse provisoire d'une authentique virulence que des traitements appropriés pourraient éventuellement restaurer.

En effet, si la plupart des auteurs s'accordent à reconnaître que la mise en culture des amibes amène progressivement la diminution,

voire la perte de leur virulence, l'on ne sait pas la cause de ce phénomène ni s'il est toujours réversible.

De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer la perte de virulence des cultures. Les unes incriminent l'amidon de riz ajouté dans les milieux ; d'autres le rôle des facteurs microbiens associés ; depuis quelques années enfin, l'on rattache ce fait aux influences de divers facteurs de croissance ou éléments du métabolisme de l'amibe, et dont on s'efforce alors de préciser le rôle. La question est donc très controversée et encore très complexe.

Nous ne nous y attarderons pas davantage, car la question de l'origine de l'avirulence des souches d'amibes n'est pas précisément notre sujet.

Celui-ci, plus modeste, s'est limité à quelques expériences effectuées dans le but de rétablir la virulence des trois souches non pathogènes dont nous disposons.

Nous ne parlerons ici que des trois procédés qui nous ont servi dans la conduite de ces expériences, à savoir :

- 1) Addition dans les cultures de produits susceptibles de favoriser la croissance des amibes et d'augmenter leur virulence.
- 2) Action du cholestérol *in vivo* chez le Rat.
- 3) Passage des souches dans le foie du Hamster.

I. — ADDITION DE PRODUITS DANS LES MILIEUX DE CULTURE

L'idée d'étudier l'action de certains produits sur la virulence des amibes de culture nous est venue à la lecture d'une communication de SINGH [84], dans laquelle l'auteur dit avoir obtenu, grâce à l'action du cholestérol, la restauration de la virulence chez deux souches primitivement avirulentes. SINGH constate en effet que, pour ces deux souches, l'addition de cholestérol dans les cultures et même la simple incubation des amibes en présence de ce produit, rétablit nettement la virulence au point de leur permettre d'infester sévèrement le Rat.

Certes, auparavant le cholestérol avait déjà été signalé comme facteur favorable à la culture de l'amibe. Mais ici, l'observation était bien plus importante et elle semblait apporter une solution à la délicate question de virulence. Nous avons donc jugé intéressant d'effectuer avec le cholestérol des expériences analogues à celles de SINGH, et de les renouveler avec deux autres produits, la *proges-*

térone et la vitamine D dont l'action favorisante sur les cultures a également été signalée.

Le protocole expérimental prévu pour chacune de ces substances a été le suivant :

- 1) Vérification de l'avirulence de chacune des trois souches par inoculations chez le Rat selon la technique d'infestation habituelle (laparotomie et injection intra-cæcale de 0,5 ml d'une culture riche).
- 2) Culture de chacune des trois souches, en présence du produit sur les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA. Etude de la quantité optimale de produit à introduire dans les milieux.
- 3) Au fur et à mesure de la culture, pratiquer des inoculations intra-cæcale chez le Rat, de manière à déterminer le temps de contact avec le produit, nécessaire à une éventuelle restauration de la virulence.
- 4) Etude de la persistance de l'effet après remise en culture normale.
- 5) En ce qui concerne le *cholestérol* : étude comparée des actions *in vitro* de l'émétine sur la souche initiale d'une part et la souche cultivée en présence de cholestérol d'autre part.

ACTION DU CHOLESTEROL "IN VITRO"

Nous résumons sous forme de tableaux les différentes expériences effectuées.

• *Première expérience (Tableau I)*

Elle a consisté, pour chacune des souches, en une étude comparée des cultures normales et des cultures effectuées en présence de cholestérol, sur le *milieu de PAVLOVA*, et aussi en la recherche, par de nombreuses inoculations au Rat, d'une éventuelle apparition d'un pouvoir pathogène.

TECHNIQUE :

- 1) Vérification de l'avirulence des souches : avec chaque souche, pratiquer chez 5 rats une inoculation intra-cæcale de 0.5 ml d'une belle culture (technique d'inoculation habituelle).
- 2) Addition du cholestérol dans les milieux de culture. Faute d'un véhicule commode pour la bonne dispersion du cholestérol dans les milieux liquides, nous l'avons utilisé sous forme

très finement pulvérisée, et stérilisé à 100°C au four. Jusqu'au quatrième repiquage, nous avons ajouté 10 mg de cholestérol dans chaque tube de culture ; ensuite 5 mg jusqu'au dixième repiquage et à partir de celui-ci nous avons seulement ajouté 1 mg par tube.

- 3) Contrôle de la virulence. A l'occasion des cultures qui nous ont semblé les plus favorables, nous avons pratiqué des inoculations avec chaque souche. Chaque inoculation fut effectuée sur un groupe de 3 rats.

RÉSULTATS (voir *Tableau I*) ET COMMENTAIRES :

Les cultures ont été maintenues pendant plus de deux mois sur le milieu de PAVLOVA, permettant ainsi, pour chaque souche, une étude de l'action du cholestérol portant sur 23 repiquages.

D'une façon générale, ainsi que l'exprime le *Tableau I*, les cultures en présence de cholestérol se sont montrées moins faciles ; et il est logique de conclure que la présence de ce produit, loin d'être favorable, a exercé une action légèrement défavorable sur les cultures.

De plus, toutes les inoculations au Rat, quelle que fut la souche, furent toujours négatives.

• *Deuxième expérience (Tableau II)*

Cette deuxième expérience est identique à la première, mais le milieu de culture est ici le milieu de BALAMUTH.

TECHNIQUE :

La technique utilisée est la même que précédemment. Toutefois, ici, dès le départ, la quantité de cholestérol a été seulement de 1 mg par tube.

RÉSULTATS (voir *Tableau II*) ET COMMENTAIRES :

L'expérience présente, avec le milieu de BALAMUTH, a été poursuivie pendant un mois et l'espace de 11 repiquages.

L'addition de cholestérol n'a pas été favorable à la culture des différentes souches : elle n'a nullement modifié leur état d'avirulence.

• *Troisième expérience*

Cette expérience est une étude comparée des activités *in vitro* du chlorhydrate d'émétine sur les souches normalement cultivées d'une

TABLEAU I

Cultures sur le milieu de Pavlova

		SANS CHOLESTEROL			AVEC CHOLESTEROL		
		Souche IP	Souche B	Souche W	Souche IP	Souche B	Souche W
L. 6 nov.	(1er R.)	++	+++ (-)	++	++	++	+
V. 10 "	(2e R.)	++	++	++	++	++	++
L. 13 "	(3e ")	++	++	+++	+	++	+++
V. 17 "	(4e ")	+++ (-)	++	+++ (-)	++	++	+++ (-)
L. 20 "	(5e ")	++	+++	+++	++	++	+++
V. 24 "	(6e ")	++	++	++	++	++	++
L. 27 "	(7e ")	++	++	++	++	++	++
V. 1 déc.	(8e ")	++	++	++	+	+	+
L. 4 "	(9e ")	+++	+++	++	++ (-)	++ (-)	++ (-)
V. 8 "	(10e ")	+++	+++	++	+	++	++
L. 11 "	(11e ")	+++	+++	++	++	++	++
V. 15 "	(12e ")	++	+++	+++	+	++	+++ (-)
L. 18 "	(13e ")	++	++	+++	++	++	++
V. 22 "	(14e ")	++	++	++	++	++	++
M. 26 "	(15e ")	+++	+++	++	+	++	++
V. 29 "	(16e ")	+++	++	++	++	+++ (-)	++
M. 2 jan.	(17e ")	++	+++	+++	++	++	++
V. 5 "	(18e ")	+++	++	+++	+	++	++
L. 8 "	(19e ")	+++	++	+++	+	++	++
V. 12 "	(20e ")	++	++	+++	++ (-)	++ (-)	+++ (-)
L. 15 "	(21e ")	+++	++	++	++	+	++
V. 19 "	(22e ")	+++	+++	++	++	++	++
L. 22 "	(23e ")	+++	++	+++	++	++	+++ (-)

Le signe (—) exprime le résultat négatif des inoculations pratiquées chez le Raton.

TABLEAU II
Cultures sur le milieu de Balamuth

		SANS CHOLESTEROL			AVEC CHOLESTEROL		
		Souche IP	Souche B	Souche W	Souche IP	Souche B	Souche W
L. 18 déc.	(1er R.)	++	++	+++ (-)	+	++	++
V. 22 "	(2e ")	++	++	++	+	++	++
M. 26 "	(3e ")	+++	+++	+++	++	++	++
V. 29 "	(4e ")	+++	+++	+++	++ (-)	++ (-)	++ (-)
M. 2 jan.	(5e ")	++	+++	++	+	+	++
V. 5 "	(6e ")	+++	++	++	+	+	+++
L. 8 "	(7e ")	++	++	++	++	+	+++ (-)
V. 12 "	(8e ")	+++	++	+	++	++	+
L. 15 "	(9e ")	++	++	+	+	++	+
V. 19 "	(10e ")	++	++	++	++	++	++
L. 22 "	(11e ")	+++	+++	++	++ (-)	++	++

part, et d'autre part sur ces mêmes souches après une culture de deux mois en présence de cholestérol.

— Milieu de culture utilisé : milieu de PAVLOVA.

— Souches étudiées : W et B.

TECHNIQUE :

Nous avons effectué avec le chlorhydrate d'émétine et suivant la technique d'essai *in vitro* précédemment décrite, des essais simultanés sur les cultures normales d'une part et sur les cultures additionnées de cholestérol d'autre part.

RÉSULTATS :

1) *Cultures normales* : concentrations minimales léthales en quarante-huit heures.

Chlorhydrate d'émétine

— Souche W 1 : 1.000.000
— Souche B 1 : 2.000.000

2) *Cultures avec cholestérol* : concentrations minimales léthales en quarante-huit heures.

Chlorhydrate d'émétine

— Souche W 1 : 1.000.000
— Souche B 1 : 2.000.000

En conclusion, la présence du cholestérol pendant deux mois dans les cultures des souches W et B n'a pas modifié leur résistance vis-à-vis du chlorhydrate d'émétine.

CONCLUSIONS :

1) En ce qui concerne les trois souches étudiées, I.P., N.S., W et les milieux de BALAMUTH et PAVLOVA, le cholestérol ajouté directement sous forme pulvérisée n'a exercé aucune influence favorable sur les cultures.

2) L'addition de cholestérol n'a nullement rétabli la virulence de ces trois souches, ni modifié la sensibilité de la souche I.P. vis-à-vis du chlorhydrate d'émétine.

ACTION DE LA PROGESTERONE ET DE LA VITAMINE D "IN VITRO"

Avec ces deux produits, nous nous sommes livrés à deux expériences identiques à celles décrites à propos du cholestérol. Toutefois, nous nous bornerons à résumer conjointement ces deux expériences, car les résultats obtenus avec l'un et l'autre produit furent identiques.

TECHNIQUE :

1) Vérification de l'avirulence de la souche W utilisée.

2) Produits utilisés :

a) *Formes d'utilisation :*

— *Progestérone* : solution huileuse renfermant 10 mg par ml.

— *Vitamine D* : solution huileuse renfermant 5 mg par ml.

b) *Quantités de produits* : elles furent les mêmes pour les deux produits :

— Première dose : 5 mg pour 5 ml de milieu, soit la concentration de 1 p. 1.000.

— Deuxième dose : 1 mg pour 5 ml de milieu, soit la concentration de 1 p. 5.000.

— Troisième dose : 1/50^e de mg pour 5 ml de milieu, soit la concentration de 1 p. 250.000.

Agitation fréquente des tubes de culture.

3) Milieux de culture utilisés : milieux liquides de BALAMUTH et de PAVLOVA.

4) Contrôle de la virulence.

RÉSULTATS :

L'expérience a été effectuée avec la souche W, sur les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA, et maintenue pendant le temps de 10 repiquages.

Nous n'avons pas observé de modifications sensibles dans les cultures qui renfermaient les produits, quelle que fût leur concentration.

Toutefois, avec la progestérone à la dose de 5 mg, nous avons obtenu sur les deux milieux de très belles cultures, mais seulement dans l'espace des deux ou trois premiers repiquages ; les cultures sont redevenues normales par la suite. Mais n'étaient-ce pas simplement les conditions d'anaérobiose provoquées par la couche de la solution huileuse du produit qui avaient momentanément influencé l'allure de la culture ?

Quoi qu'il en soit, toutes les inoculations faites au raton pour contrôler la virulence furent négatives.

CONCLUSIONS :

Ces quelques expériences nous permettent de conclure que ni la progestérone ni la vitamine D n'ont exercé d'action favorable sur la culture ou le pouvoir pathogène des cultures d'amibes dont nous disposons.

II. — ACTION DU CHOLESTÉROL "IN VIVO" CHEZ LE RAT

Notre deuxième série d'expériences avec le cholestérol découle aussi des travaux antérieurs de SINGH [84]. Poursuivant *in vivo* l'étude de l'action du cholestérol, cet auteur constate en effet qu'à l'égard de ses deux souches d'expérience, l'administration préalable par voie buccale de cholestérol chez le Rat a le même effet que l'addition de ce produit dans les cultures.

SINGH obtient ainsi les résultats suivants :

- 1° Les deux souches, primitivement avirulentes pour le Rat, parviennent à infester cet animal lorsque celui-ci reçoit du cholestérol à raison de 0,50 g/kg par jour pendant sept jours avant l'inoculation.
- 2° Les mêmes souches parviennent également à infester le Rat lorsque celui-ci est soumis au même traitement aussitôt après l'inoculation.

Pour notre part, et en dépit des résultats peu encourageants des essais *in vitro*, nous nous sommes livrés, avec les trois mêmes souches d'amibes (I.P., N.S., W), à de nouvelles expériences analogues à celles de SINGH.

Voici le protocole expérimental que nous nous proposons de suivre dans ces expériences, en cas de résultats positifs.

- 1° Vérification de l'avirulence de nos souches : inoculations dans le cæcum du rat.
- 2° Etude de l'action du cholestérol :
 - Premier essai : inoculation au Rat et administration du cholestérol pendant sept jours.
 - Deuxième essai : administration au Rat du cholestérol pendant sept jours, et inoculation.
 - Troisième essai : administration du cholestérol pendant sept jours : inoculation le septième jour et nouvelle administration de cholestérol pendant les sept jours suivants. Autopsie des animaux et contrôle des résultats le huitième jour après l'inoculation.
- 3° Etude de la persistance :
 - a) de l'action du cholestérol chez l'animal remis à un régime normal ;
 - b) de la virulence de la souche par passage chez l'animal normalement nourri.
- 4° Détermination de la dose minimale active de cholestérol.
- 5° Etude des influences de la durée du traitement par le cholestérol et de l'âge des animaux.

Nos expériences ne nous ont malheureusement pas apporté les résultats positifs que nous en escomptions. Elles ne purent donc être poursuivies au delà du deuxième stade du programme d'étude prévu.

Nous exposons néanmoins, ci-dessous, la technique utilisée dans ces expériences et les résultats obtenus.

TECHNIQUE :

- 1° Souches d'amibes utilisées : les souches W, I.P. et N.S., en cultures sur le milieu de PAVLOVA.
- 2° Animaux : rats de trois ou quatre semaines.
- 3° Produit : cholestérol. Utiliser le cholestérol cristallisé sous forme finement pulvérisée et en solution dans l'huile d'olive, à la dose journalière de 0,500 g/kg d'animal, sous un volume de 0,2-0,3 ml de solution. Administrer le produit par la voie orale, pendant sept jours, au moyen d'une seringue à insuline munie d'une canule.

4^o Inoculation.

Pratiquer les inoculations selon la technique habituelle : mise des animaux à la diète hydrique : anesthésie à l'éther et inoculation intra-cæcale, après laparotomie, de 0.5 ml de culture riche (renfermant environ 50.000 à 100.000 amibes).

Pour l'étude de l'action du cholestérol, pratiquer les inoculations deux heures avant ou après la première ou la septième dose de cholestérol.

5^o Contrôle des infestations.

Autopsier les animaux le huitième jour après l'inoculation.

Lire et exprimer les résultats selon la technique habituelle.

Première expérience :

Vérification de l'avirulence des souches I.P., N.S., W

- Le 14 novembre 1961 : inoculations de 3 rats par souche.
- Le 21 novembre : sacrifice des rats et examens des cæcums : chez tous les animaux, *degré 0* d'infestation.

CONCLUSION : infestations négatives ; souches avirulentes.

Deuxième expérience :

Inoculation — Traitement par le cholestérol

- Le 21 novembre 1961 : inoculations de 5 rats avec chaque souche.
- Du 21 au 27 novembre : administration quotidienne de cholestérol.
- Le 28 novembre : sacrifice des rats et examens des cæcums :
 - 2 animaux morts en cours d'expérience ;
 - chez les 13 autopsiés : infestations *degré 0*.

CONCLUSION : infestations négatives.

Troisième expérience :

Traitement par le cholestérol : inoculations

- Du 29 novembre au 5 décembre 1961 : administration quotidienne de cholestérol.
- Le 5 décembre : inoculations de 5 rats avec chaque souche.
- Le 12 décembre : sacrifice des rats et examens des cæcums.
 - 1 mort en cours d'expérience ;
 - chez les 14 autopsiés : infestations *degré 0* (présence de mucus dans 5 cæcums).

CONCLUSION : infestations négatives.

Quatrième expérience :

Traitement par le cholestérol : inoculation :
nouveau traitement par le cholestérol

Nous n'avons utilisé que la souche N.S. dans cette expérience.

— Du 8 au 14 décembre 1961 : administration quotidienne de cholestérol.

— Le 14 décembre : inoculation de 6 rats avec la souche W.

— Du 15 au 20 décembre : administration quotidienne de cholestérol.

— Le 21 décembre : sacrifice des rats et examens des cæcums :

— 3 morts au cours d'expérience ; chez 2 autopsiés le quatrième jour de l'inoculation, infestations *degré 0* ;

— chez les 3 sacrifiés : infestations *degré 0*.

CONCLUSION : infestations négatives.

CONCLUSIONS GENERALES

Le traitement des rats par le cholestérol avant ou après l'inoculation n'a pas modifié leur sensibilité vis-à-vis de nos trois souches N.S., I.P., W qui sont ainsi demeurées incapables de les infester.

III. — PASSAGE DES SOUCHES
DANS LE FOIE DU HAMSTER DORÉ

Ce procédé, préconisé pour la restitution du pouvoir pathogène des souches d'amibes dysentériques, a vu le jour en 1951 avec les travaux de REINERTSON et THOMPSON [75] sur l'amibiase hépatique expérimentale du Hamster doré.

Ces auteurs, après avoir mis en évidence la possibilité pour les souches d'amibes de produire des abcès amibiens dans le foie de cet animal, montrèrent en effet que plusieurs passages dans ces conditions restituaient aux souches devenues avirulentes le pouvoir d'infester le cæcum du Rat.

Par la suite, d'autres expériences analogues sont venues confirmer cette observation ou, pour le moins, elles ont montré que le passage dans le foie du Hamster augmentait la virulence des souches vis-à-vis du cæcum du Rat (NEAL et VINCENT [65], NEAL [63], WILLIAMS [96]).

En conséquence, à l'heure actuelle, il est assez généralement admis que ce procédé rétablit la virulence des souches et qu'il permet de distinguer celles qui sont véritablement apathogènes de celles qui ont temporairement perdu leur virulence.

PREMIERE SERIE D'EXPERIENCES

Dans cette première série d'expériences, nous avons utilisé la souche I.P., entretenue sur les milieux habituels, et nous avons scrupuleusement appliqué la technique de REINERTON et THOMPSON [75].

• *Technique de Reinerton et Thompson*

ANIMAUX :

Utiliser des Hamsters dorés, de sexe indifférent, âgés de un mois et pesant de 40 à 50 grammes.

INOCULATION :

- a) Pratiquer une laparotomie sous anesthésie à l'éther.
- b) Injecter dans le lobe droit du foie un faible volume d'inoculum renfermant de 25.000 à 50.000 amibes. Humecter l'orifice de l'injection avec une solution de thrombase.
- c) Protéger l'animal contre l'infection bactérienne par les antibiotiques.

RÉSULTATS :

Nous avons pratiqué des inoculations intra-hépatiques chez plus de 25 hamsters, mais dans un seul cas nous avons obtenu des lésions du foie.

a) Le seul hamster positif nous avait paru amaigri et malade ; c'est ainsi que l'ayant sacrifié le sixième jour, l'autopsie nous a révélé un foie partiellement mais sévèrement atteint, présentant des lésions blanchâtres renfermant de nombreuses amibes mobiles.

A partir d'une suspension dans l'eau physiologique du broyat de foie infesté, nous avons pratiqué :

- une mise en culture sur le milieu N de l'I.P. : cette culture fut positive, mais deux tentatives d'infestation de 3 rats, effectuées au moment des deuxième et troisième repiquages, restèrent négatives ;
- l'inoculation directe dans le foie de 3 nouveaux hamsters : ces inoculations furent négatives : 2 hamsters sacrifiés le huitième jour présentèrent un foie sain, le troisième survécut normalement.

Faute de rats disponibles le jour de la découverte du hamster infesté, nous n'avons pas pu pratiquer d'inoculation directe dans le cæcum du Rat.

- b) Dans tous les autres cas, nous n'avons abouti qu'à des échecs :
- les hamsters qui furent sacrifiés et autopsiés vers le huitième jour présentèrent tous un foie sain. Chez quelques animaux, nous avons observé de petits abcès microbiens, mais ceux-ci isolés et d'allure kystique étaient uniquement dus aux bactéries, ainsi que nous l'ont confirmé les examens microscopiques, et l'échec des cultures faites pour chercher à dépister les amibes ;
 - les hamsters qui ne furent pas sacrifiés survécurent normalement sans présenter de troubles.

DEUXIEME SERIE D'EXPERIENCES

En dépit de nos premiers résultats peu encourageants, nous nous sommes livrés à une deuxième série d'expériences au moyen d'une technique légèrement différente.

En effet, dans nos premières expériences, si 24 inoculations sur 25 pratiquées chez le Hamster n'avaient pas été positives, nous avons tout de même obtenu, dans un cas, une véritable infestation avec abcès hépatique. Or, cet abcès du foie était sûrement dû en partie du moins, aux amibes, puisque celles-ci s'y trouvaient encore six jours après l'inoculation en nombre considérable et très vivaces.

Bien qu'isolé, ce résultat nous fit penser que la cause de nos échecs ne résidait pas dans la nature de la souche utilisée, mais plutôt dans la technique d'inoculation que nous pratiquions.

La technique que nous avons utilisée était celle de THOMPSON et REINERTSON ; et au cours de nos inoculations, nous nous étions bien rendus compte qu'il avait été difficile de toujours l'appliquer convenablement.

En effet, pour deux raisons qui concourent d'ailleurs à la même difficulté d'exécution, la technique de THOMPSON et REINERTSON nous semble nécessiter un tour de main particulier. Il s'agit des raisons suivantes :

- l'utilisation des animaux jeunes, pesant de 40 à 50 grammes ;
- l'injection dans le lobe droit du foie.

Nous nous sommes bien rendus compte, en effet, qu'il est difficile chez l'animal endormi à l'éther d'immobiliser suffisamment le lobe droit du foie (même à l'aide de pinces très fines et garnies de

coton) et de pratiquer dans sa faible épaisseur l'injection de l'inoculum virulent, sans que celui-ci ne ressorte instantanément. De plus, chez un animal de 40 à 50 g, la difficulté ne peut qu'être augmentée à cause du faible volume du foie.

• *Modification à la technique de Thompson et Reinertson*

THOMPSON et REINERTSON ont précisé eux-mêmes que ni l'âge, ni la quantité d'amibes inoculées n'avaient d'influence sensible sur le résultat de l'infestation. C'est pourquoi nous avons adopté une nouvelle manière d'opérer qui ne diffère de la technique originale que par les deux points suivants :

- utilisation de Hamsters plus âgés, donc de taille supérieure ;
- injections profondes dans la masse du foie et non spécialement dans le lobe droit.

Techniques opératoires

ANIMAUX :

Utiliser des Hamsters dorés de sexe indifférent, âgés de deux mois ou plus et pesant de 100 à 150 grammes.

INOCULATIONS :

a) Dans le foie du Hamster : anesthésier l'animal à l'éther et pratiquer une laparotomie au niveau du foie avec incision de 2,5 cm environ. Effectuer deux ou trois injections profondes dans les parties les plus épaisses du foie en injectant environ 0,1 à 0,2 ml de culture riche renfermant de 25.000 à 50.000 amibes. Suture les parois au simple fil de lin.

b) Dans le cæcum du Rat : pratiquer l'inoculation intra-cæcale selon la technique habituelle (voir page 131) d'environ 0,5 ml d'une suspension du broyat du foie de hamster infesté, dans du sérum physiologique.

1) EXPERIENCES PRATIQUEES AVEC LA SOUCHE N.S.

• *Première expérience*

6 avril 1962 :

Inoculations dans le foie de 3 hamsters.

12 avril :

Sacrifice et autopsie.

— 2 hamsters présentent un foie sain.

- 1 hamster a le foie infesté et hypertrophié : présence de grosses lésions grisâtres dans plus de la moitié de l'organe. A l'examen microscopique : observation de très nombreuses amibes mobiles, ne renfermant pas d'hématies.

A partir d'une suspension dans l'eau physiologique du broyat du foie infesté, nous avons pratiqué :

- un ensemencement sur le milieu N de l'I.P. : la culture est positive après trois jours ;
- des inoculations dans le cæcum de 3 rats : un animal meurt le quatrième jour ; les deux autres, sacrifiés le huitième jour, ne sont pas infestés ;
- des inoculations dans le foie de 3 nouveaux hamsters (*premier passage direct*) : un animal meurt le troisième jour ; un autre le cinquième jour, mais ce dernier, autopsié, présente un foie très atteint et renfermant de nombreuses amibes.

17 avril :

Sacrifice et autopsie du troisième hamster survivant : l'animal présente un foie très infesté par de nombreuses amibes.

A partir d'un broyat de foie :

- ensemencement sur les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA ;
- inoculations chez 3 rats : un mort le deuxième jour ; les deux autres ne sont pas infestés après huit jours.

• Deuxième expérience

Le 8 mai :

Inoculations d'une culture riche, âgée de quatre jours, dans le foie de 5 hamsters.

- 3 morts les deuxième, sixième et septième jours.

15 mai :

Autopsie des 2 hamsters survivants.

Chaque hamster présente un foie très lésé et riche en amibes.

A partir d'un broyat des deux foies :

- inoculations chez 3 rats : négatives au bout de huit jours ;
- inoculations à 3 hamsters : un meurt le troisième jour ; un autre autopsié, le sixième jour, présente un foie sain.

22 mai :

Sacrifice et autopsie du troisième hamster.

Il présente un foie infesté riche en amibes.

A partir d'un broyat de foie :

- inoculations à 3 rats : négatives après huit jours.

2) EXPERIENCES PRATIQUES AVEC LA SOUCHE W

6 avril 1962 :

Inoculations dans le foie de 3 hamsters.

— 1 mort le sixième jour.

12 avril :

Sacrifice et autopsie des 2 hamsters survivants.

— 1 animal a le foie sain.

— L'autre présente un foie très infesté, avec d'importantes lésions et de nombreuses amibes. Les amibes ne renferment pas d'hématies.

A partir d'un broyat de foie infecté :

— ensemencement sur le milieu N de l'I.P. : culture positive ;

— inoculations à 3 rats : un meurt le troisième jour ; les deux autres sacrifiés le sixième jour ne sont pas infestés ;

— inoculations à 3 hamsters (*premier passage direct*).

18 avril :

Sacrifice et autopsie des 3 hamsters.

Les 3 hamsters sont infestés ; les foies présentent d'importantes lésions riches en amibes.

A partir d'un broyat unique des 3 foies :

— inoculations à 3 rats : négatives après huit jours.

3) EXPERIENCES PRATIQUES AVEC LA SOUCHE I.P.

4 mai 1962 :

Inoculations dans le foie de 4 hamsters.

11 mai :

Sacrifice et autopsie des animaux.

— 1 hamster a le foie sain et normal.

— 3 hamsters présentent un foie infecté avec de nombreuses lésions riches en amibes.

A partir d'un broyat d'ensemble :

— ensemencement sur les milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA : cultures positives ;

— inoculations à 5 hamsters (*premier passage direct*) : 2 meurent le sixième jour, dont l'un autopsié présente un foie malade.

17 mai :

Sacrifice et autopsie des 3 hamsters survivants.

Les 3 hamsters présentent un foie infecté ; nombreuses amibes ; pas d'hématies.

A partir d'un broyat des foies :

- ensemencement sur le milieu de PAVLOVA ; culture positive. Avec cette culture, les inoculations à 3 ratons sont négatives après huit jours ;
- inoculations à 3 ratons : négatives après huit jours ;
- inoculations à 4 hamsters (*deuxième passage*).

23 mai :

Sacrifice et autopsie d'un des 4 hamsters inoculés le 17 mai.

Il présente un foie très altéré ; nombreuses lésions grisâtres, noirâtres par endroit, et renfermant de nombreuses amibes. Les amibes ne renferment pas d'hématies.

A partir du broyat de foie :

- inoculations à 3 ratons : négatives après huit jours.

25 mai :

Sacrifice et autopsie des 3 hamsters survivants.

- 1 hamster a le foie sain.

— 2 hamsters présentent un foie infecté : présence de nombreuses amibes. Chez 1 hamster, les amibes semblent renfermer des hématies (examen direct).

A partir d'un broyat des foies :

- ensemencement sur le milieu N de l'I.P. : culture positive ;
- inoculations à 3 ratons : négatives après huit jours ;
- inoculations à 4 hamsters (*troisième passage direct*) : 2 hamsters meurent les quatrième et cinquième jours.

30 mai :

Sacrifice et autopsie des 2 hamsters survivants.

Les 2 animaux sont infestés.

A partir du broyat des foies :

- inoculations à 4 hamsters (*quatrième passage direct*) : 1 animal meurt le sixième jour.

6 juin :

Sacrifice et autopsie des 3 hamsters survivants.

- 1 hamster a le foie sain.
- Les deux autres sont infestés.

A partir du broyat des foies infectés :

- ensemencement sur le milieu de PAVLOVA ; culture positive. Avec cette culture, les inoculations à 3 ratons sont négatives après huit jours ;
- inoculations à 3 ratons : négatives après six jours ;
- inoculations à 3 hamsters (*cinquième passage direct*) : 1 hamster meurt le septième jour.

12 juin :

Sacrifice et autopsie de l'un des 2 hamsters survivants.

Il présente un foie infecté.

A partir d'un broyat de foie malade :

— inoculations à 3 rats : négatives après huit jours ;

— le troisième hamster a survécu au delà du dixième jour de l'inoculation.

CONCLUSIONS

Grâce à l'utilisation de Hamsters pesant de 100 à 150 g et surtout à la pratique d'inoculations profondes en deux ou trois points différents du foie, nous avons obtenu avec nos trois souches des résultats très comparables, soit environ 75 p. 100 d'infestations positives.

En règle générale, les animaux infestés moururent entre le sixième et le huitième jour.

NATURE DES LÉSIONS :

Les lésions observées sont généralement localisées, mais parfois étendues à presque tout le foie. Elles se développent en profondeur dans la masse de l'organe et présentent extérieurement un aspect grisâtre.

L'examen microscopique direct a permis d'observer dans chaque cas :

- a) de nombreuses amibes, de taille variable (de 15 à 35 μ environ) et parfois très mobiles. Dans un seul cas, nous avons observé des amibes qui renfermaient des hématies ;
- b) de très nombreuses hématies, des globules blancs et des bactéries.

Dans quelques rares cas, nous avons trouvé des abcès uniquement microbiens ; l'aspect de ces abcès est particulier, comme nous l'avons déjà signalé, et nous ne les avons trouvés que dans des foies apparemment sains et ne renfermant pas d'amibes.

MISE EN CULTURE :

L'ensemencement des amibes trouvées dans les lésions hépatiques a toujours donné des cultures positives avec les trois milieux usuels : milieu N de l'I.P., milieux de BALAMUTH et de PAVLOVA. Il n'y eut pas de difficulté à la poursuite de ces cultures.

INOCULATIONS AU RAT :

Pas une seule fois, que ce soit par l'inoculation de récentes cultures tirées des foies infectés ou par l'injection du broyat de ces foies, nous n'avons réussi l'implantation des amibes de nos souches dans le cæcum du Rat.

C'était là notre principal objectif ; ces expériences ne nous ont pas permis d'y parvenir.

PASSAGES SUCCESSIFS DANS LE FOIE DU HAMSTER :

Ces passages furent relativement faciles à obtenir et donnèrent souvent 100 p. 100 de résultats positifs. Nous n'avons pas observé de sensible aggravation de l'affection hépatique avec le nombre des passages. Seul le pourcentage des infestations positives a légèrement augmenté.

DISCUSSION DES RÉSULTATS DE NOS EXPÉRIENCES CHEZ LE HAMSTER

A partir de 3 souches, au départ non virulentes pour le Rat, nous avons obtenu environ 75 p. 100 d'infestations positives du foie du Hamster et réalisé plusieurs passages successifs dans le foie de cet animal. Cependant, en dépit de ces passages *in vivo*, le pouvoir pathogène des 3 souches n'a pas été modifié et celles-ci sont demeurées incapables d'infester le cæcum du Rat.

1° Dans la mesure où nous pouvons considérer nos infestations chez le Hamster comme d'authentiques infections amibiennes, nos résultats se trouvent en désaccord avec l'hypothèse selon laquelle les souches génétiquement virulentes retrouvent leur pouvoir pathogène vis-à-vis du Rat à la suite de passages dans le foie du Hamster, tandis que celles génétiquement incapables d'infester le cæcum du Rat ne survient pas dans le foie du Hamster.

En effet, nous devrions conclure que nos trois souches sont génétiquement incapables de déterminer des lésions cæcales chez le Rat, puisqu'elles ne l'ont point fait après plusieurs passages dans le foie du Hamster. Mais alors pourquoi infestèrent-elles le foie du Hamster ? La souche I.P. a été ainsi maintenue plus d'un mois dans le foie du Hamster (cinq passages successifs).

2° Si toutefois l'hypothèse précédente est valable et si nos souches sont réellement avirulentes pour le cæcum du Rat, que cette qualité soit innée ou qu'elle ait été acquise, pour tenter d'expliquer

ces infestations hépatiques obtenues chez le Hamster, peut-être faudrait-il admettre une grande part de responsabilité de la flore bactérienne associée aux amibes dans ces lésions ; admettre également pour les amibes une possibilité de vie saprozoïtique *in vivo*, puisqu'elles auraient dans le foie du Hamster assuré leur survivance à partir des seules bactéries et des produits du métabolisme microbien.

Nos expériences n'ont pas été suffisamment nombreuses pour nous permettre de conclure. Des expériences similaires dans lesquelles on essaierait de détruire les bactéries par une thérapeutique sélective, pourraient fournir une réponse à ces questions. Dans de telles expériences, l'on pourrait se rendre compte si la suppression ménagée des bactéries des lésions hépatiques entraîne également la disparition des amibes, ou si un tel traitement oblige celles-ci à modifier leur métabolisme vers l'hématophagie, c'est-à-dire vers une exaltation de leur virulence.

3° Ou bien, dans une autre possibilité rejetant cette hypothèse qui implique la distinction entre souche pathogène et souche non pathogène, ne vaut-il pas mieux admettre avec DOBELL

« que n'importe quelle souche peut être pathogène pour des individus particuliers et dans des conditions particulières ».

En l'occurrence, nos trois souches (complexe amibes + bactéries) seraient suffisamment virulentes pour infester le foie du Hamster, organe particulièrement vulnérable, mais insuffisamment pour ulcérer le cæcum du Rat.

**ESSAIS PHARMACOLOGIQUES
CHEZ LE HAMSTER DORE SPONTANEMENT INFESTE
PAR "ENTAMŒBA CRICETI"**

AVANT-PROPOS

Une des premières qualités d'un essai pharmacologique est d'être facilement reproductible. Nous avons également insisté au cours de notre travail sur l'intérêt qu'il y avait à ce que cet essai comporte deux épreuves successives, l'une effectuée *in vitro*, l'autre *in vivo*.

Or, compte tenu de nos expériences, si nous estimons que les méthodes d'étude *in vitro* sont actuellement satisfaisantes et aisément reproductibles, nous sommes par contre bien obligés d'admettre que l'étude chez l'animal, en particulier chez le Rat, n'offre pas, comme on l'aurait souhaité, l'avantage d'être praticable à volonté ; la raison de cet état de choses ne résidant pas, comme nous l'avons montré, dans un défaut de la méthode, mais uniquement dans la difficulté que l'on éprouve à se procurer opportunément une souche d'amibes virulentes et à pouvoir l'entretenir au laboratoire.

Désireux de compenser cet inconvénient, nous avons alors cherché à mettre au point une technique commode et, à cet effet, nous nous sommes adressés à une amibiase spontanée chez un animal courant de laboratoire.

Deux possibilités se présentaient : il s'agissait d'une part de la parasitose du Rat due à *Entamoeba muris*, et d'autre part de celle du Hamster doré, due à *Entamoeba criceti*. Nous les avons envisagées l'une et l'autre.

I. — LA PARASITOSE DU RAT

Bien que l'on ne sache pas encore avec certitude si *Entamoeba muris* et *Entamoeba criceti* sont un seul et même parasite (NEAL [62], PRUSS [69, 70, 71]) ou si le second est une « race écologique » du premier (DENNIS, BERBERIAN, HANSEN [26]), pour deux raisons, cependant, nous avons écarté l'utilisation de la parasitose du Rat.

1° Chez le Rat, en effet, le pourcentage des animaux infestés est variable et le degré d'infestation n'est pas stable.

Selon FULTON et JOYNER [40], 65 p. 100 des ratons de trois ou quatre semaines sont infestés par *Entamoeba muris* ; chez des ratons du même âge, SCHNEIDER et MONTEZIN [77] trouvent 56 p. 100 d'infestation.

Nos observations personnelles ont porté sur de nombreux ratons âgés de trois à quatre semaines et normalement nourris. Nous avons constaté chez ces animaux un pourcentage d'infestation voisin de 100 p. 100 ; celui-ci ne varie donc que faiblement avec l'âge des animaux. En revanche, le degré de l'infestation s'est révélé extrêmement variable d'un animal à l'autre ; nous avons observé, en effet, une densité variant de 1 à 10 amibes dans 25 champs (objectif Zeiss 10/0,25 ; oculaire Zeiss 8 ×) notamment chez les animaux jeunes, jusqu'à 5 à 25 amibes dans un seul champ (même grossissement) chez des animaux plus âgés.

2° De plus, il ressort de quelques essais chimiothérapeutiques effectués dans l'amibiase spontanée du Rat qu'*Entamoeba muris* manifeste une sensibilité relativement inconstante vis-à-vis de certains amœbicides classiques. NEAL [62] et HEGNER et ESKRIDGE [44] ont montré, en effet, une action nulle de l'émétine et de la carbasone, tandis que selon PRUSS [71] la diphétarsonsone exerce une action équivalente sur les deux amibes.

II. — LA PARASITOSE DU HAMSTER

Contrairement à ce qui s'observe chez le Rat, l'infestation du Hamster par *Entamoeba criceti* semble offrir des conditions satisfaisantes à la mise au point d'une technique d'essai pharmacologique.

1° Les hamsters adultes sont infestés dans une proportion voisine de 100 p. 100 et le degré d'infestation est relativement stable.

Selon DENNIS, BERBERIAN et HANSEN [26], PRUSS [70, 71], tous les hamsters d'un poids supérieur à 80 g sont infestés par *Entamoeba criceti*, car il existe une nette augmentation du pourcentage d'infestation avec l'âge des animaux.

Nos observations confirment tout à fait cette constatation. Nous avons examiné plus de 50 hamsters, et nos conclusions sont les suivantes : tous les hamsters de plus de 100 g sont infestés par *Entamoeba criceti* ; le degré d'infestation, voisin d'un animal à l'autre, est de l'ordre de 1 à 5 amibes par champ microscopique (objectif Zeiss 10/0,25 ; oculaire Zeiss 8 ×).

2° De plus, dans la parasitose du Hamster, des essais chimiothérapiques ont déjà été effectués par plusieurs auteurs (DENNIS et BERBERIAN [25], DENNIS, BERBERIAN et HANSEN [26], PRUSS [71], SURREY, LESCHER et WINTROP [87], BERBERIAN, SLIGTER et SURREY [5]). Dans l'ensemble, les résultats obtenus furent satisfaisants ; ils donnent ainsi la preuve que l'amibiase du Hamster peut servir à l'étude pharmacologique *in vivo*.

III. — TRAVAUX PERSONNELS

Pour notre part, utilisant l'infestation du Hamster, nous nous sommes livrés à plusieurs essais chimiothérapiques avec des amœbicides connus et avec de nouveaux produits. Nous avons ainsi cherché à mettre en évidence la corrélation entre les sensibilités d'*Entamœba criceti* et d'*Entamœba dysenteriae* vis-à-vis des médicaments amœbicides, et ce faisant, tâché de montrer l'intérêt qu'il y avait à adopter la parasitose du Hamster comme base d'une méthode d'essai rapide et commode, complémentaire de l'épreuve pharmacologique *in vitro*.

TECHNIQUE OPÉRATOIRE

ANIMAUX

Utiliser des hamsters pesant environ 100 à 140 grammes et qui sont infestés dans une proportion voisine de 100 p. 100. Les animaux que nous avons utilisés présentaient toujours de nombreuses amibes (1 à 5 par champ microscopique : objectif Zeiss 10/0,25 ; oculaire Zeiss 8 X), bien mobiles.

TRAITEMENT

Administrer le médicament par la voie buccale sous un volume n'excédant pas 1 ml. Dans les conditions normales d'exécution, le traitement doit être maintenu pendant cinq jours, à raison d'une dose par jour.

CONTROLE

Sacrifier les animaux vingt-quatre à soixante-douze heures après la dernière prise du médicament. Confectionner des frottis avec le contenu intestinal, après autopsie, et examiner immédiatement ces

frottis au microscope (grossissement habituel : voir plus haut). Pour éviter le refroidissement de la préparation qui entraîne l'immobilisation des amibes, il est pratique d'opérer au moyen d'un microscope muni d'une platine chauffante ou dans une étuve à microscope genre étuve de Foot.

Les animaux sont considérés comme COMPLÈTEMENT déparasités si AUCUNE amibe vivante n'a pu être décelée après examen de 25 champs microscopiques.

Il convient de remarquer que certains animaux traités ne présentent plus que quelques amibes vivantes (par exemple 1 à 5 amibes pour 25 champs microscopiques); nous avons convenu de considérer ces animaux, chez lesquels la drogue a manifestement exercé une action certaine mais incomplète, comme PARTIELLEMENT déparasités.

Un lot de hamsters ne recevant aucun traitement sert de témoin d'infestation; chez ces animaux, l'infestation est de l'ordre de 1 à 5 amibes par champ microscopique.

• Première expérimentation

Produit : C.I.433 (dichlorhydrate de 5-chloro-7 (3-diéthylaminopropyl-aminoéthyl) 8-oxyquinoléine).

Le C.I.433, nous l'avons vu, a manifesté une assez nette efficacité dans nos essais *in vitro*. Nous avons poursuivi l'épreuve pharmacologique de ce produit au moyen de la technique d'essai *in vivo* décrite précédemment.

PREMIERE SERIE D'ESSAIS

Dans une première série d'essais, les hamsters ont reçu en une ou deux prises quotidiennes des doses allant de 100 à 800 mg/kg. pendant un à cinq jours.

Les résultats de ces essais sont consignés dans le *Tableau I*.

DEUXIEME SERIE D'ESSAIS

Dix hamsters ont été traités de la manière suivante :

- 150 mg/kg en une seule prise le premier jour ;
- 150 mg/kg en deux prises (25 mg) les deuxième, troisième et quatrième jours ;
- 150 mg/kg en une seule prise le cinquième jour.

Dix hamsters ont été conservés comme témoins ; l'autopsie a été pratiquée le huitième jour.

Résultats :

Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats suivants :

- les 10 animaux témoins montrent en moyenne 3 à 5 amibes vivantes par champ microscopique ;
- pour les 10 animaux traités :
 - 4 présentaient 1 à 5 amibes pour 25 champs ;
 - 3 présentaient 5 à 10 amibes pour 25 champs ;
 - 3 présentaient 10 à 20 amibes pour 25 champs ;

soit 4 animaux *partiellement* déparasités et chez les autres une diminution sensible du nombre des parasites par rapport aux témoins.

TROISIEME SERIE D'ESSAIS

Dix hamsters ont été traités de la manière suivante :

- 150 mg/kg en une seule prise le premier jour ;
- 200 mg/kg en 2 prises (100 mg) les deuxième, troisième et quatrième jours ;
- 150 mg/kg en une seule prise le cinquième jour.

Dix hamsters ont été conservés comme témoins : l'autopsie a été pratiquée le huitième jour.

Résultats :

- Les 10 animaux témoins montrent en moyenne 3 à 5 amibes vivantes par champ microscopique.
- Sur 10 animaux traités :
 - 3 sont complètement déparasités ;
 - 5 présentaient 1 à 5 amibes pour 25 champs ;
 - 1 présente 10 amibes environ pour 25 champs ;
 - 1 présente sensiblement autant de parasites que les animaux témoins ;

soit 3 animaux *complètement* déparasités, 5 animaux *partiellement* déparasités, et une diminution du nombre des amibes dans un cas.

CONCLUSIONS :

1) Le Hamster supporte mal les doses les plus élevées de C.I.433. Les doses de 100 mg/kg en une seule prise quotidienne ou de 150 à 200 mg/kg en deux prises quotidiennes ne provoquent aucune mortalité après un traitement de *cinq* jours.

2) Le C.I.433 possède une action manifeste dans l'amibiase spontanée du Hamster :

- a) Des doses quotidiennes de 150 à 200 mg/kg, administrées par la voie orale en une ou deux prises et répétées pendant

Essai du C.I. 433
dans l'ambiasse spontanée du Hamster
(administration orale)

Doses quotidiennes (en mg/kg)	Nombre de prises quotidiennes	Durée du traitement (en jours)	Nombre d'animaux	Nombre de morts	Nombre d'animaux déparasités	
					Complètement	Partiellement
800	1	1	5	5	-	-
400	1	1	5	4	1	
200	1	2	5	1	3	1
175	1	5	5	1	3	1
150	1	5	10	2	4	4
200	2	5	5	1	2	2
100	1	5	5	0	0	0
Témoins	-j	-	10	0	0	0

cinq jours consécutifs, sont assez efficaces, puisque sur un total de 40 animaux ainsi traités :

— 12 sont *complètement* déparasités (soit 30 p. 100);

— 16 sont *partiellement* déparasités (soit 40 p. 100).

La prolongation de la cure ou son renouvellement aurait sans doute permis d'obtenir des pourcentages de guérisons plus élevés.

b) Une dose de 100 mg/kg, répétée pendant *cinq* jours, est inactivée.

3) L'efficacité du C.I.433 s'étend également aux flagellés de l'intestin du hamster, pour des doses quotidiennes de 175 à 200 mg/kg répétées pendant *cinq* jours consécutifs.

Dans les expériences suivantes, nous avons utilisé quelques-uns des médicaments classiques de l'amibiase. Nous les avons essayés à des doses voisines des doses actives dans l'amibiase expérimentale du Rat ; notre but a été ainsi de chercher à démontrer que les résultats fournis par l'essai chez le Hamster doré, spontanément infesté, étaient, dans une certaine mesure, comparables à ceux obtenus avec le test classique utilisant l'amibiase expérimentale du Rat (*Entamoeba dysenteriae*).

A) Les amœbicides diffusibles

• Deuxième expérimentation

Produit : CHLORHYDRATE D'ÉMÉTINE.

PREMIERE SERIE D'ESSAIS

Dans une première série d'essais, 10 hamsters reçoivent, par la voie sous-cutanée, une dose quotidienne correspondant à 20 mg/kg.

Dix animaux ont servi de témoins pour cette expérimentation et pour les deux suivantes qui furent effectuées simultanément.

Résultats :

— Les 10 animaux témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.

— Chez les animaux traités, après 2 injections :

— 3 sont morts le troisième jour ;

- 7 sont autopsiés le troisième jour dont 3 sont *partiellement* déparasités (de 1 à 10 amibes pour 25 champs) et chez les 4 autres, on constate une légère diminution du nombre des amibes par rapport aux témoins.

DEUXIEME SERIE D'ESSAIS

Dix animaux ont reçu par la voie sous-cutanée une dose quotidienne de 10 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Chez les animaux traités, après 4 injections :
 - 5 sont morts le cinquième jour (soit 50 p. 100 de mortalité);
 - 5 sont autopsiés le cinquième jour, dont 2 sont *partiellement* déparasités ; chez les 3 autres, on constate une légère diminution du nombre des amibes par rapport aux témoins.

CONCLUSION :

1) Le Hamster est très sensible à l'action du chlorhydrate d'émétine, qui s'est révélé toxique pour cet animal aux doses de 10 à 20 mg/kg (50 p. 100 de mortalité après quatre prises et 30 p. 100 après 2 prises).

2) Avec les faibles doses essayées, en raison de la toxicité du produit, les animaux traités ne sont que *partiellement* déparasités.

• Troisième expérimentation

Produit : CHLORHYDRATE DE 2-DÉHYDROÉMÉTINE.

PREMIERE SERIE D'ESSAIS

Dans une première série d'essais, 10 hamsters ont été traités par la voie sous-cutanée, avec une dose quotidienne de 20 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Chez les animaux traités, après 2 injections :
 - 3 sont morts le troisième jour ;
 - 7 sont autopsiés le troisième jour, dont 3 sont *partiellement* déparasités, et chez les 4 autres on constate une légère diminution du nombre des amibes par rapport aux témoins.

DEUXIEME SERIE D'ESSAIS

Dix animaux ont reçu, par voie cutanée, une dose quotidienne de 10 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Chez les animaux traités, après 4 injections :
 - 1 mort le cinquième jour (10 p. 100 de mortalité);
 - 9 sont autopsiés le cinquième jour, dont : 3 sont *partiellement* déparasités, et chez les 6 autres, on constate une légère diminution du nombre des amibes par rapport aux témoins.

CONCLUSIONS :

1) Bien qu'à un degré moindre qu'avec le chlorhydrate d'émétine, le Hamster est sensible à l'injection sous-cutanée du chlorhydrate de 2-déhydroémétine qui a occasionné 10 p. 100 de mortalité après 4 injections de 10 mg/kg et 30 p. 100 de mortalité après 2 injections de 20 mg/kg.

2) A ces doses essayées, les animaux traités ne sont que partiellement déparasités.

• Quatrième expérimentation

Produit : CONESSINE.

PREMIERE SERIE D'ESSAIS

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours consécutifs, une dose quotidienne de 100 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Chez les 10 animaux traités, après autopsie le huitième jour, on constate sensiblement autant de parasites que chez les animaux témoins (1 à 2 amibes par champ).

DEUXIEME SERIE D'ESSAIS

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale, *une seule* prise de 300 mg/kg.

Résultats :

Tous les animaux sont morts le deuxième jour (soit 100 p. 100 de mortalité).

CONCLUSION :

1) Le Hamster supporte 5 prises quotidiennes de 100 mg/kg de conessine : mais cette dose n'a pas d'action sur le nombre de parasites (*Entamoeba criceti*) hébergés par cet animal.

2) Une dose supérieure, soit 300 mg/kg, est toujours mortelle pour l'animal.

B) Les amœbicides de contact

• *Cinquième expérimentation*

Produit : ENTOBEX.

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours consécutifs, une dose quotidienne de 150 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Les 10 animaux traités ne présentent *aucune* amibe dans 25 champs ; soit 100 p. 100 d'animaux *complètement* déparasités.

CONCLUSIONS :

1) Le hamster supporte bien 5 prises quotidiennes de 150 mg/kg d'entobex.

2) Cette dose est très efficace puisque tous les animaux traités sont *complètement* déparasités.

3) A la même dose, l'efficacité de l'entobex s'étend également aux flagellés de l'intestin du hamster qui sont détruits dans une très forte proportion (près de 100 p. 100).

• *Sixième expérimentation*

Produit : ENTAMIDE.

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours, une dose quotidienne de 30 mg/kg.

Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Les 10 animaux traités ne présentent *aucune* amibe dans 25 champs, soit 100 p. 100 d'animaux *complètement* déparasités.

CONCLUSIONS :

- 1) Le Hamster supporte bien *cinq* prises quotidiennes de 30 mg/kg d'Entamide.
- 2) Avec cette dose, 100 p. 100 des animaux sont *complètement* déparasités.

• *Septième expérimentation*

Produit : FUROATE D'ENTAMIDE.

Dix animaux ont reçu par voie buccale et pendant cinq jours, une dose quotidienne de 15 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Les 10 animaux traités ne présentent *aucune* amibe dans 25 champs, soit 100 p. 100 d'animaux *complètement* déparasités.

CONCLUSIONS :

- 1) Le Hamster supporte bien *cinq* prises quotidiennes de 15 mg/kg de furoate d'entamide.
- 2) Avec cette dose, 100 p. 100 des animaux sont *complètement* déparasités.

• *Huitième expérimentation*

Produit : PARAMIBE.

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours, une dose quotidienne de 300 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Les 10 animaux traités ne présentent *aucune* amibe dans 25 champs, soit 100 p. 100 d'animaux *complètement* déparasités.

CONCLUSIONS :

1) Le Hamster supporte bien 5 prises quotidiennes de 300 mg/kg de paramibe.

2) Avec cette dose, 100 des animaux sont *complètement* déparasités.

3) L'efficacité du paramibe s'étend aux flagellés de l'intestin du hamster qui sont détruits dans une proportion supérieure à 50 p. 100.

• *Neuvième expérimentation*

Produit : VIOFORME.

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours, une dose quotidienne de 300 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Sur 10 animaux traités :
 - 8 sont *complètement* déparasités ;
 - 2 sont *partiellement* déparasités.

CONCLUSIONS :

1) Le Hamster supporte bien 5 prises quotidiennes de 300 mg/kg de vioforme.

2) Avec cette dose, 80 p. 100 des animaux sont *complètement* déparasités, et 20 p. 100 le sont *partiellement*.

• *Dixième expérimentation*

Produit : DIPHÉTARSONE.

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours, une dose quotidienne de 300 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne 1 à 5 amibes par champ.
- Les 10 animaux traités ne présentent *aucune* amibe dans 25 champs, soit 100 p. 100 d'animaux *complètement* déparasités.

CONCLUSIONS :

1) Le Hamster supporte bien 5 prises quotidiennes de 300 mg/kg de diphétarsonne.

2) Avec cette dose, 100 p. 100 des animaux sont *complètement* déparasités.

3) L'efficacité de la diphétarsonne s'étend aux flagellés de l'intestin du hamster qui sont détruits dans une proportion voisine de 100 p. 100.

• *Onzième expérimentation*

Produit : DIREXIODE.

Dix animaux ont reçu, par la voie buccale et pendant cinq jours, une dose quotidienne de 300 mg/kg. Dix animaux ont servi de témoins.

Résultats :

- Les 10 témoins montrent en moyenne de 1 à 5 amibes par champ.
- Sur 10 animaux traités :
 - 8 sont *complètement* déparasités ;
 - 2 sont *partiellement* déparasités.

CONCLUSIONS :

1) Le Hamster supporte bien 5 prises quotidiennes de 300 mg/kg de direxioide.

2) Avec cette dose, 80 p. 100 des animaux sont *complètement* déparasités, et 20 p. 100 le sont *partiellement*.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dès le départ, nous admettions les deux inconvénients majeurs d'une technique d'essai utilisant l'amibiase spontanée du Hamster :

- 1° *Entamoeba criceti* est une espèce différente d'*Entamoeba dysenteriae*.
- 2° La parasitose du Hamster, ne comportant pas d'ulcérations, ne permet pas d'évaluer l'effet du médicament sur les lésions de l'intestin.

Toutefois, dans la mesure où une telle technique fournit des résultats comparables à ceux obtenus avec le test classique utilisant l'amibiase expérimentale du Rat, n'est-il pas logique de lui accorder quelque attention ?

RESULTATS OBTENUS

1) AMŒBICIDES DIFFUSIBLES

Le chlorhydrate d'émétine, le chlorhydrate de 2-déhydroémétine et la conessine, à des doses comparables aux doses efficaces dans l'amibiase du Rat, n'ont pas eu d'action notable dans l'amibiase spontanée du Hamster. Par ailleurs, la toxicité de ces produits vis-à-vis du Hamster, animal particulièrement vulnérable, nous a empêché d'étudier des doses plus fortes.

— *Remarque* : étant donné le mode d'action des amœbicides diffusibles qui agissent essentiellement par la voie sanguine sur les amibes hématophages au niveau des lésions intestinales, un tel résultat peut être considéré comme assez logique, car dans l'amibiase du Hamster, *Entamoeba criceti* est une amibe non hématophage qui ne provoque pas d'ulcérations du cæcum.

2) AMŒBICIDES DE CONTACT

En revanche, nous avons étudié l'action de 7 amœbicides classiques, dont l'action s'exerce par contact direct sur les amibes et les kystes libres dans l'intestin ; ils se sont montrés tous très actifs dans l'amibiase du Hamster, à des doses tout à fait voisines des doses efficaces dans l'amibiase expérimentale du Rat.

De l'ensemble de ces expériences, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- 1° Les *amœbicides diffusibles* semblent inactifs dans l'amibiase du Hamster qui ne paraît pas utilisable pour mettre en évidence leur activité spécifique.
- 2° Les *amœbicides de contact*, au contraire, sont très actifs dans l'amibiase du Hamster ; les résultats qu'ils ont fournis montrent une sensibilité pharmacologique très comparable pour *Entamoeba criceti* et pour *Entamoeba dysenteriae*.

Avec ces corps, la validité du test chez le Hamster se trouve donc nettement mise en évidence.

Par ailleurs, la méthode d'essai que nous proposons présente deux avantages incontestables :

- a) elle permet l'étude *in vivo* de l'activité d'un médicament et donne des indications précieuses sur sa toxicité éventuelle ;
 - b) elle est reproductible à volonté et est d'une exécution facile.
-

RESUME ET CONCLUSIONS

Le premier stade de l'étude de l'activité amœbicide d'un nouveau médicament est une épreuve de laboratoire qui consiste à soumettre ce médicament à une série d'essais pharmacologiques.

Ces essais sont de deux sortes, il s'agit d'essais *in vitro* et d'essais *in vivo*. Ils ont pour but de sélectionner les médicaments, d'en révéler l'efficacité et de faire connaître leur mode d'action, en même temps qu'ils fournissent de précieuses indications thérapeutiques (toxicité, posologie).

Pour la réalisation de cette épreuve, en raison du grand nombre de médicaments proposés et surtout de l'inévitable répétition des essais, il va de soi qu'il y a grand intérêt à ce que les méthodes utilisées soient précises et facilement reproductibles.

A l'origine de ce travail, notre première étude a été effectuée en ce sens ; et c'est ainsi que nous avons constaté que dans leur grande majorité les méthodes existantes ne présentaient pas les avantages souhaités ou comportaient, pour le moins, certaines imperfections et difficultés.

Nous avons, dès lors, cherché à remédier à cet état de choses : et nos recherches furent ainsi effectuées en vue d'apporter une contribution à la mise au point de méthodes d'essais, pratiques et commodés qui soient facilement applicables aux nouveaux médicaments.

L'ESSAI PHARMACOLOGIQUE "IN VITRO"

L'essai pharmacologique *in vitro* consiste dans son principe en la confrontation directe du médicament avec les amibes entretenues en culture. L'étude de cette première épreuve a déterminé les travaux des deux premiers chapitres de cet ouvrage.

- *Premier chapitre : la culture de l'amibe dysentérique*

Avant de parvenir à l'essai *in vitro*, il nous est apparu indispensable d'effectuer une étude préalable sur la culture de l'amibe dysentérique.

Nous avons donc brièvement exposé l'historique de la culture de l'amibe et passé en revue les principales méthodes proposées pour sa culture. Ensuite, nous avons plus particulièrement insisté sur la technique de préparation et l'utilisation pratique de trois milieux de culture. Nous avons personnellement éprouvé ces milieux et nous les considérons parmi tous les autres, comme étant les plus convenables à l'entretien régulier des souches au laboratoire et à l'exécution des essais pharmacologiques *in vitro*.

- *Deuxième chapitre : les méthodes d'essais « in vitro »*

Dans ce chapitre, nous avons exposé en détail les deux techniques d'essais *in vitro* qui ont résulté de nos recherches.

Cet exposé a été précédé de quelques indications sur les principaux médicaments de l'amibiase, que nous avons pour la plupart utilisés dans nos travaux ; puis, également dans un paragraphe préliminaire, nous avons décrit les principales techniques d'essais qui ont servi de point de départ à celles que nous avons présentées.

Le dernier paragraphe de ce chapitre est le résumé de quelques essais pharmacologiques *in vitro*.

L'ESSAI PHARMACOLOGIQUE "IN VIVO"

L'essai pharmacologique *in vivo* consiste en l'étude de l'activité amœbicide chez un animal naturellement, ou mieux, expérimentalement infesté. Les troisième et quatrième chapitres exposent les recherches que nous avons effectuées dans ce domaine.

- *Troisième chapitre : l'essai chez un animal expérimentalement infesté*

La méthode d'essai qui utilise une amibiase expérimentale résulte nécessairement d'un choix : choix de l'animal d'une part, et de la technique d'infestation d'autre part.

Nous avons ainsi consacré deux paragraphes successifs à ces questions : le premier traite des animaux, le second des techniques

d'infestation. Les méthodes de JONES et de SCHNEIDER et MONTEZIN qui ont servi de point de départ à nos recherches, sont ensuite exposées dans le troisième paragraphe.

Puis nous avons exposé nos travaux personnels qui ont essentiellement porté sur deux points de l'amibiase expérimentale du Rat : la question d'*Entamoeba muris*, et celle de l'infestation du Rat ; ce deuxième point a consisté en une étude du problème de la virulence des souches d'amibes de culture.

1) LA QUESTION D' " ENTAMOEBA MURIS "

De nos travaux, nous avons conclu que la présence d'*Entamoeba muris* chez le Rat n'oppose qu'une difficulté mineure à l'exécution de l'essai pharmacologique ; pour la résoudre, nous avons proposé une nouvelle technique d'essai.

2) VIRULENCE DES SOUCHES D' " ENTAMOEBA DYSENTERIÆ "

Nous avons essayé trois procédés pour tenter de faire apparaître la virulence chez les souches non pathogènes. Trois souches avirulentes ont servi à nos recherches, et nous avons étudié l'action de quelques produits (cholestérol, progestérone, vitamine D) à la fois *in vitro* dans les cultures et *in vivo* chez l'animal, de même que l'effet du passage des souches dans le foie du Hamster. Nous n'avons malheureusement pas obtenu les résultats positifs escomptés.

Le manque de virulence de la plupart des souches d'amibes dysentériques dont on peut facilement disposer en France, reste ainsi l'entrave essentielle à la reproductibilité de l'essai pharmacologique dans l'amibiase expérimentale.

Le chapitre suivant est consacré à une étude dont le but a été de pallier cet inconvénient.

• *Quatrième chapitre : l'essai chez un animal naturellement infesté*

En nous inspirant de travaux antérieurs, nous avons effectué plusieurs essais pharmacologiques en utilisant une technique fondée sur l'amibiase spontanée du Hamster.

Les résultats que nous avons obtenus ont été suffisamment satisfaisants ; ajoutés à ceux de nos devanciers, ils permettent ainsi de légitimer l'utilisation de la méthode d'essai chez le Hamster comme test commode, et complémentaire de l'épreuve pharmacologique *in vitro*.

Vu le Président de Thèse
Professeur R. CAVIER

Vu le Doyen de la Faculté
Professeur G. VALETTE

Vu et Permis d'imprimer
le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. BALAMUTH (W.). — *Amer. J. Clin. Path.*, 1946, **16**, pp. 380-384.
2. BALAMUTH (W.). — *Antibiot. Med.*, 1955, **1**, p. 625.
3. BAETJER (W.), SELLARDS (A.). — *Johns Hopkins Hosp. Bull. Balt.*, 1914, **25**, pp. 165-173.
4. BAETJER (W.), SELLARDS (A.). — *Johns Hopkins Hosp. Bull. Balt.*, 1914, **25**, pp. 237-241.
5. BERBERIAN (D.A.), SLIGHTER (R.G.), SURREY (A.R.). — *Antibiotics a. Chemotherapy*, avril 1961, **11**, n° 4, pp. 245-255.
6. BIAGI (F.), ROBLEDO (E.), SERVIN (H.), MARTUSCELLI (A.). — *The Amer. J. of Trop. Med. and Hyg.*, mai 1962, vol. II, p. 333.
7. BLANC (F.) et coll. — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, **54**, p. 29.
8. BOECK-DRBOHLAV. — *Amer. J. of Hyg.*, 1925, V, p. 371.
Proceedings Nation. Academy of Sc., 1925, II, pp. 235 et 727.
Ann. de Paras., 1925, III, pp. 349, 357-368.
9. BONNIN (H.), MORETTI (G.P.) et GUIGNARD (J.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, pp. 37 et 39.
10. BRADIN (J.L.) et HANSEN (E.L.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1950, **30**, 27-41.
11. BROSSI (A.) et coll. — *Helv. Chem. Acta*, 1959, **42**, p. 772.
12. BRUMPT (E.). — *Précis de Parasitologie*, t. I, Paris, Masson édit.
13. CARNERI (I. DE). — *Arch. Internat. Pharmacodyn.*, 1958, **113**, p. 273.
14. CARRERA (G.M.) et FAUST (E.C.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1949, **29**, p. 647.
15. CAVIER (R.). — *Thérapie*, 1958, **13**, p. 296.
16. CAVIER (R.). — *Médecine Tropicale*, 1959, **19**, p. 619.
17. CAVIER (R.). — Travail non publié. (Conférence faite en février 1962, à Pointe-à-Pitre, Guadeloupe.)

18. CAVIER (R.), SAVEL (J.) et GLAUDON (F.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1962, **55**, pp. 378-382.
19. CEDILLOS (R.A.), REEVES (R.E.) and SWARTZWELDER (J.C.). — *Experimental Parasitology*, 1961, II, pp. 305-310.
20. CHIANG (S.F.). — *Proc. Nat. Acad. of Sc.*, 1925, **11**, pp. 239-245 ; in *Bull. Inst. Pasteur*, 1927, **25**, pp. 426-427.
21. COURDURIER. — *Thèse de Doctorat en Médecine*, Bordeaux, 1934.
22. CUCKLER (A.C.) et coll. — *Arch. Internat. Pharmacodyn.*, 1958, **114**, p. 683.
23. DALE (H.H.) et DOBELL (C.). — *J. Pharmacol.*, 1917, **10**, p. 699. (Cités par GOODWIN et coll. [42].)
24. DASPECT et JONCHÈRES. — *Bull. Soc. Path. Exot.*, octobre 1933, p. 995.
25. DENNIS (E.W.) et BERBERIAN (D.A.). — *Antibiot. Chemoter.*, 1954, **4**, p. 554.
26. DENNIS (E.W.), BERBERIAN (D.A.) et HANSEN (S.S.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1949, **29**, p. 683.
27. DESCHIENS (R.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, p. 1356.
28. DESCHIENS (R.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1929, vol. 101, n° 22, pp. 665-667.
29. DESCHIENS (R.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1934, n° 10.
30. DESCHIENS (R.) et CHIPCHIDZE (N.). — *C.R. Soc. Biol.*, janvier 1930, vol. 103, n° 4, pp. 226-228.
31. DESCHIENS (R.) et PROVOST (A.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1937, **8**, pp. 648-654.
32. DOBELL (C.). — *The amoebae living in man*, London, John Bale and Sons, 1919.
33. DOBELL (C.). — *Parasitology*, 1927, **14**, p. 288.
34. DOBELL (C.). — *Parasitology*, 1928, **20**, p. 357.
35. DOBELL (C.). — *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, suppl. 1947, p. 201.
36. DOBELL (C.) et LAIDLAW (P.P.). — *Parasitology*, 1926, **18**, p. 283.
37. DOLKART (R.E.) et HALPERN (B.). — *Amer. J. Trop. Med. and Hyg.*, 1958, **7**, p. 595.
38. FAUST (E.C.), SCOTT (L.C.) et SWARTZWELDER (J.C.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 1934, **32**, p. 540.
39. FRYE (W.W.) and MELENEY (H.E.). — *Amer. J. of Hyg.*, 1932, **16**, p. 739.
40. FULTON (J.D.) et JOYNER (L.P.). — *Nature*, 1848, **161**, p. 66.

41. GONZÁLES DE COSSIO (A.). — *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao Paulo, 1960, **2**, p. 313.
42. GOODWIN (L.C.), HOARE (C.A.) et SHARP (T.M.). — *Brit. J. Pharmacol. Chemoter.*, 1948, **3**, p. 44.
43. GUIGNARD (J.M.). — *Thèse de Doctorat en Médecine*, Bordeaux, 1948-1949.
44. HEGNER (R.W.) et ESKRIDGE (L.). — *J. Parasitol.*, 1937, **23**, p. 105.
45. JARUMILINTA (R.) and MALGRAITH (B.G.). — *Ann. Trop. Med.*, 1961, **55**, p. 383.
46. JEAN-BAPTISTE (J.A.). — *Thèse de Doctorat en Pharmacie*, Paris, 1943.
47. JONES (W.R.). — *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1946, **40**, p. 130.
48. JONES (W.R.). — *Exper. Parasitol.*, 1952, **1**, p. 118.
49. KESSEL (J.F.). — *Univer. of California publ. in Zool.*, 1923, **10**, pp. 401-408 et pp. 409-430; in *Bull. Inst. Pasteur*, 1925, **23**, pp. 493-494.
50. KRADOLFER (F.) et NEIPP (L.). — *Antibiot. Chemoter.*, 1958, **8**, p. 297.
51. KIWABARA (N.). — *Keijo J. Med.*, 1931, **2**, 28.
52. LAIDLAW (P.), DOBELL (C.) et BISCHOP (A.). — *Parasitology*, 1928, **20**, pp. 207-220.
53. LAMY (L.). — *Biol. Méd.*, 1953, **42**, pp. 209-271.
54. LAMY (L.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, p. 115.
55. LAMY (L.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, n° 3, pp. 453-458.
56. LANGERON. — *Précis de Microscopie*. Paris, Masson éd., 1949.
57. LOGEMANN (W.), ALMIRANTE (L.) et CARNERI (I. DE). — *Il Farmaco, Ed. Sc.*, 1958, **13**, p. 139.
58. LUTTERMOSER (G.W.), HASKINS (W.T.), COLEMAN (N.) et JUMPER (J.R.). — *Amer. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 1952, **1**, pp. 162-170.
59. LYNCH (J.E.), BAMFORTH (B.J.) et GOECKERITZ (D.). — *Antibiot. Chemoter.*, 1956, **6**, p. 330.
60. MORITA (Y.J.). — *Orient. Med. (Abstr. Sect.)*, 1938, **28**, p. 40. (Cité par DOLKART et HALPERN [37].)
61. MUDROW-REICHENOW (L.). — *Zeitschrift f. Trop. Med. u. Parasit.*, 1956, **7**, p. 198.
62. NEAL (R.A.). — *Nature*, London, 1949, **163**, pp. 99-100.
63. NEAL (R.A.). — *Parasitology*, 1950, **40**, p. 343.
64. NEAL (R.A.) and VINCENT (P.). — *Brit. J. Pharmacol.*, 1955, **10**, p. 434.

65. NEAL (R.A.) and VINCENT (P.). — *Parasitology*, 1956, **46**, p. 173.
66. PAVLOVA (E.A.). — *Med. Parasit. Parasitic. Dis.*, 1938, **7**, p. 224. (Cité par DE CARNERI [13].)
67. PELOUX (Y.). — *Thèse de Doctorat en Médecine*, Lyon, 1949.
68. PIETTE (M.). — *Thèse de Doctorat en Médecine*, Paris, 1948.
69. PRUSS (J.). — *Zeitschrift für Tropenmed. u. Parasitol.*, 1959, **10**, pp. 30-36.
70. PRUSS (J.). — *Zeitschrift für Tropenmed. u. Parasitol.*, 1960, **11**, pp. 190-206.
71. PRUSS (J.). — *Zeitschrift für Tropenmed. u. Parasitol.*, 1960, **11**, pp. 306-315.
72. REES (C.W.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, **3**, pp. 442-449.
73. REES (C.W.), KEY (I.) and SHAFER (J.G.). — *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 1960, **9**, pp. 164-167.
74. REEVES (R.E.), MELENEY (H.E.) and FRYE (W.W.). — *Amer. J. Hyg.*, **66**, p. 56. (Cité par CEDILLOS et coll. [19].)
75. REINERTSON (J.W.) et THOMPSON (P.E.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1951, **76**, pp. 518-521.
76. SAUTET (J.). — *Ann. de Paras.*, 1929, VII, pp. 64-79.
77. SCHNEIDER (J.) et MONTEZIN (G.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1948, **41**, p. 521.
78. SCHNEIDER (J.) et MONTEZIN (G.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1949, **42**, p. 94.
79. SCHNEIDER (J.) et MONTEZIN (G.). — *Bull. Soc. Patm. Exot.*, 1951, **44**, p. 298.
80. SCHNEIDER (J.) et MONTEZIN (G.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1951, **232**, p. 2370.
81. SCHWARTZ (D.E.) et RIEDER (J.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, **54**, p. 38.
82. SIMITCH (T.S.). — *Ann. de Parasitol. Hum. et Compar.*, 1930, VIII, pp. 225-230.
83. SIMITCH (T.S.) et PETROVITCH (Z.). — *Ann. de Parasitol. Hum. et Compar.*, 1951, **26**, p. 389.
84. SINGH (B.N.). — *J. of Scientific and Industr. Research*, 1959, vol. 18C, n° 9, pp. 166-169.
85. SOHIER (R.) et PELOUX (Y.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, p. 151.
86. SAINT JOHN (J.H.). — *Amer. J. of Trop. Med.*, 1930, XII, pp. 606-613.
87. SURREY (A.R.), LESHER (G.Y.) et WINTROP (S.O.). — *J. Amer. Chim. Soc.*, 1955, **77**, pp. 5406-5408.
88. TANABE (M.) et CHIBA (E.). — *Acta Medic. in Keijo*, 1928, vol. 11, n° 3, pp. 63-66.

89. TAYLOR (D.J.) et coll. — *Amer. J. Trop. Med.*, 1950, **30**, p. 817.
 90. TAYLOR (D.J.) et GREENBERG (J.). — *Amer. J. Hyg.*, 1952, **56**, p. 58.
 91. THOMPSON (P.E.). — *Antibiot. Med.*, 1955, **1**, p. 603.
 92. THOMPSON (P.E.) et LILLIGREN (B.L.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1949, **29**, p. 323.
 93. THOMPSON (P.E.) et REINERTSON (J.W.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1951, **31**, p. 707.
 94. THOMPSON (P.E.), DUNN (M.C.), BAYLES (A.) et REINERTSON (J.W.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1950, **30**, p. 203.
 95. TOBIE (J.E.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1949, **29**, p. 859.
 96. WILLIAMS (G.A.). — *Brit. J. Pharmacol.*, 1959, **14**, p. 488.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
--------------------	---

Chapitre I

LA CULTURE DE L'AMIBE DYSENTERIQUE

I. — Aperçu historique	15
II. — Principales techniques de culture	23
III. — Etude particulière de trois milieux de culture	34
IV. — Conduite de la culture et facteurs influençants	39
a) Conduite des cultures	39
b) Action de la température	43
c) pH des cultures	47
d) La flore associée	49
e) Les aliments figurés et éléments divers	51
V. — Morphologie et cycle de développement de l'amibe dysentérique en culture	55
VI. — Conclusions	60

Chapitre II

LES TECHNIQUES D'ESSAI « IN VITRO »

Avant-propos	63
I. — Les principaux amœbicides	65
II. — Rappel de quelques techniques antérieures	79
III. — Conditions de l'essai « in vitro »	84
IV. — Description de deux techniques d'essai « in vitro »	87
a) Epreuve de l'inhibition au départ de la culture	88
b) Epreuve de l'action léthale sur la culture de trois jours	90
V. — Application à l'étude de quelques produits	93

Chapitre III

L'EXPERIMENTATION « IN VIVO »

Avant-propos	121
I. — Exposé historique	123
a) <i>Les animaux de laboratoire</i>	123
b) <i>Les méthodes d'inoculation à l'animal</i>	128
c) <i>Les techniques de Jones et de Schneider et Montezin</i>	131
II. — Travaux personnels	134
a) « <i>Entamoeba muris</i> »	135
b) <i>Le problème d'« Entamoeba muris ». Ses solutions</i>	138
c) <i>Une nouvelle technique d'essai « in vivo »</i>	142
d) <i>Nos expériences sur la virulence de trois souches d'amibes dysentériques en culture</i>	145

Chapitre IV

ESSAIS PHARMACOLOGIQUES CHEZ LE HAMSTER DORE
SPONTANEMENT INFESTE PAR « ENTAMOEBA CRICETI »

Avant-propos	167
I. — La parasitose du Rat	168
II. — La parasitose du Hamster	169
III. — Travaux personnels	170
RESUME ET CONCLUSIONS	183
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	187

